



HAL
open science

Caractérisation structurale et fonctionnelle de SpNox, une NADPH oxydase bactérienne

Annelise Vermot

► **To cite this version:**

Annelise Vermot. Caractérisation structurale et fonctionnelle de SpNox, une NADPH oxydase bactérienne. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV056 . tel-04430623

HAL Id: tel-04430623

<https://theses.hal.science/tel-04430623v1>

Submitted on 1 Feb 2024

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Annelise VERMOT

Thèse dirigée par **Franck FIESCHI**

et co-encadrée par **Susan SMITH**, Kennesaw State University

préparée au sein du **Laboratoire Institut de Biologie Structurale**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Caractérisation structurale et fonctionnelle de SpNox, une NADPH oxydase bactérienne

Structural and functional studies of SpNox, a prokaryotic NADPH oxidase

Thèse soutenue publiquement le **31 janvier 2020**,
devant le jury composé de :

Madame LAURA BACIOU

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS ILE-DE-FRANCE GIF-SUR-
YVETTE, Rapporteuse

Monsieur DANIEL PICOT

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION PARIS-CENTRE,
Rapporteur

Madame SANDRINE OLLAGNIER DE CHOUDENS

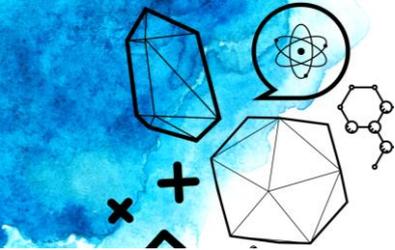
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES,
Présidente

Monsieur HUGUES NURY

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES, Examineur







Caractérisation structurale et fonctionnelle de SpNox, une NADPH oxydase bactérienne

En tant qu'enzymes spécialisées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), le rôle des NADPH oxydases (NOX) s'étend à de nombreux processus physiologiques majeurs, et la dérégulation de celles-ci peut conduire à une grande variété de pathologies sévères, telles que le diabète ou les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, constituant ainsi une cible primordiale pour le développement de solutions thérapeutiques spécifiquement adaptées. Malgré la découverte récente d'homologues procaryotes de NOX, facilitant la production de ces protéines en quantités compatibles pour les études mécanistiques, et constituant ainsi des modèles favorisant l'étude fonctionnelle et structurale de la famille des NADPH oxydases, la résolution d'une structure haute résolution sous forme entière est toujours demeurée sans solution.

Ainsi, à travers l'utilisation d'une approche interdisciplinaire, ce projet a pour but de relever les enjeux majeurs associés à l'obtention de cristaux dont la qualité de diffraction permettrait la résolution de la première structure d'un homologue de NADPH oxydase sous forme entière issu de *Streptococcus pneumoniae* (SpNox), complexifiée par la présence de larges zones hydrophobes intrinsèques au rôle de transfert d'électrons à travers les membranes de ces protéines, et pouvant altérer la formation et l'intégrité des contacts cristallins.

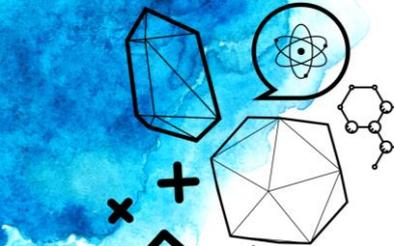
Des conditions optimales de détergents et de tampons au sein de laquelle l'enzyme combine une importante activité associée à une haute thermostabilité ont été identifiées par criblage systématique des conditions de sels et pH pour la purification de l'enzyme et ainsi optimiser la préservation de l'intégrité de la protéine afin de favoriser la qualité des cristaux obtenus. De plus, à travers l'implémentation d'étapes conjointes de criblages ainsi que d'affinements automatiques et manuels extensifs, un effort intense a ainsi été initié afin d'optimiser le processus de cristallogénèse et des avancées majeures ont pu être réalisées concernant la cristallisation de SpNox permettant d'améliorer la diffraction des cristaux initiaux de 11Å à 4.3Å.

En parallèle, une caractérisation basse résolution, réalisée par diffusion des neutrons aux petits angles, a permis de déterminer une enveloppe globale de la protéine. Le volume de cette enveloppe, plus large que le modèle d'homologie de la protéine sous forme entière reconstituée par l'ancrage des deux domaines modélisés indépendamment, suggère l'existence d'une flexibilité importante de SpNox dans la région charnière entre les domaines TM et DH, fournissant ainsi des informations essentielles et apportant une explication aux difficultés rencontrées pour abaisser la limite de résolution des cristaux.

Afin de s'affranchir de la flexibilité liée à la présence de deux domaines structurellement indépendants au sein de la protéine, une stratégie complémentaire, impliquant la caractérisation structurale de chacun des domaines dissociés de SpNox a été initiée en caractérisant indépendamment avec succès les domaines transmembranaire (TM) et déshydrogénase (DH) de SpNox. Des développements considérables ont été réalisés grâce à l'obtention de cristaux du domaine déshydrogénase, dont la qualité a permis la collecte de données selon des limites de diffraction atteignant 1.8Å permettant ainsi d'accéder à des informations à une résolution atomique, autorisant la visualisation de détails structuraux au sein de ce domaine, qui, en association avec le modèle d'homologie du TM obtenu par une approche bioinformatique, peut servir à guider certaines études fonctionnelles.

Enfin, le traitement des données de diffractions de manière à interpréter l'anisotropie au sein de cristaux de SpNox entière, et ainsi extraire le maximum d'informations contenant les détails structuraux, la résolution atteinte a pu être améliorée à 3.2Å selon le meilleur axe de diffraction, et pourrait ainsi permettre ainsi de résoudre la première structure basse résolution de NOX entière. Bien que la qualité de la densité électronique obtenue ne permette pas la visualisation de l'ensemble des détails nécessaires à la compréhension de la mécanistique enzymatique et au design spécifique d'inhibiteurs, l'obtention de cette structure, présentant probablement un état ouvert de la protéine compatible avec la flexibilité démontrée par les études SANS, constitue une avancée importante vers l'obtention d'une structure haute résolution. En effet, l'observation de distances approximatives entre les résidus pourra permettre une approche de biologie moléculaire à travers des processus de mutagenèses informé par les données structurales, afin notamment d'introduire des mutations stabilisantes, ou permettant de ponter les deux domaines et ainsi de réduire la flexibilité de l'enzyme constatée lors de l'étude SANS.

Cette stratégie pourrait résulter en une amélioration significative de la résolution de 3.2Å des cristaux de SpNox sous forme entière et constituerait un progrès considérable vers le but ultime de ce projet complexe.



Structural and functional characterization of SpNox, a bacterial NADPH oxidase

As specialized reactive oxygen species (ROS) producers, the involvement of the NADPH oxidase (NOX) enzymes extends to many crucial physiological processes. Thus, a NOX misregulation can lead to a wide range of severe pathologies including atherosclerosis, hypertension, diabetic nephropathy, lung fibrosis, cancer, or neurodegenerative diseases giving this membrane protein a strong therapeutic interest.

Despite the recent success in finding prokaryotic NOX homologs enabling the production of such proteins in quantity compatible with mechanistic studies, thus furnishing good models for both functional and structural studies, all the attempts to obtain a NOX structure at high resolution always remained abortive.

Thus, using an interdisciplinary approach, this project aims to overcome the challenges of this membrane protein crystallization therefore increasing diffraction of the *Streptococcus pneumoniae* NOX homolog (SpNox) crystals and allowing to solve the first structure of a full length NOX homolog at atomic level, hampered by the presence of large hydrophobic zones contacts related to the inherent function of transmembrane electron transfer performed by this protein family and that can prevent the formation of crystal.

Using a systematic approach involving both a salt and pH screening by the NanoDSF technic, the optimal conditions for detergent and buffer composition in which the enzyme combines significant activity associated with high thermostability has been identified therefore enabling to preserve the integrity of the protein in order to promote the quality of the crystals obtained.

In addition, through the joint implementation of screening steps as well as extensive automatic and manual refinements, an intense effort was initiated to optimize the process of crystallogenes and major advances have been reached regarding the crystallization of SpNox allowing to improve the diffraction of the initial crystals from 11Å to 4.3Å.

In parallel, the overall envelope of SpNox has been determined by low-resolution characterization carried out by small angles neutron scattering. The volume of this envelope appears larger than the homology model of the full-length protein computed by anchoring the two domains modeled separately, thereby revealing the existence of a significant flexibility at the hinge region between the transmembrane (TM) and dehydrogenase (DH) domains of SpNox besides providing essential information towards the impediment encountered in lowering the crystal resolution limit.

In order to overcome the flexibility related to the presence of two structurally independent domains within the enzyme, a complementary strategy involving the structural determination of each SpNox dissociated domains was initiated by successfully characterizing the isolated TM and DH domains. Indeed, extensive developments have been performed by the achievement in growing dehydrogenase domain crystals with the quality required to allow the collection of diffraction data at 1.8Å, thus supplying information at atomic resolution for the visualization of structural details within this domain. Associated with the TM homology model provided by a bioinformatic analysis these data could serve to guide further functional studies.

Finally, overcoming the difficulty created by the anisotropy of full length SpNox crystals while the processing of the diffraction patterns allowed to collect the structural details contained in high resolution data and increase the resolution to 3.2Å along the best diffraction axis. These progresses could potentially lead to the unprecedented determination of the low resolution structure of a full length NOX enzyme. Although the electron density quality is still too weak to reveal the crucial structural elements giving access to the understanding of the enzymatic mechanics along with the design of specific inhibitors, this structure highlights an open state conformation of SpNox in agreement with the flexibility demonstrated by SANS studies and represents a major breakthrough towards the high resolution structure. Indeed, based on the evaluation of approximate distances between residues, a molecular biology approach could be initiated through mutagenesis processes informed by structural data, providing hints in the identification of potential aminoacids that could likely be substituted to particularly introduce stabilizing mutations, or decrease the flexibility of the enzyme by bridging the two domains. This strategy could ultimately improve the quality of the crystallization conditions that previously led to 3.2Å diffracting SpNox crystals leading to a substantial advance that would represent a significant milestone in this intricate project.

Remerciements

Je souhaite adresser mes remerciements au Dr Laura Baciou et au Dr Daniel Picot pour avoir accepté d'examiner le manuscrit de thèse présenté, ainsi que le Dr Sandrine Ollagnier de Choudens et le Dr Hugues Nury pour avoir accepté de se constituer membres du jury.

Je tiens particulièrement à remercier mes directeurs de thèse le Pr Susan Smith ainsi que le Pr Franck Fieschi pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail. C'est avec un grand plaisir que j'ai pu évoluer sur le sujet, et j'ai particulièrement apprécié la confiance qui m'a été accordé ainsi que la liberté concernant l'approche adoptée pour analyse de mes données malgré l'aspect pouvant parfois être perçu comme quelque peu singulier en biologie. Merci à Susan de m'avoir vivement encouragé à développer cette démarche et de m'avoir transmis des compétences en bioinformatique. Au-delà des considérations scientifiques, j'ai pu profiter d'une excellente compagnie aux Etats-Unis pour découvrir les environs de Kennesaw et Washington, avec un soin particulier à proposer des événements inoubliables, des spécialités locales, ainsi que activités choisies avec soin pour correspondre à mes centres d'intérêts. J'en profite également pour remercier toutes les personnes de l'équipe de Kennesaw, et particulièrement Sarah, qui a veillé à faciliter chacune de mes venues au laboratoire.

Merci à Franck d'avoir été attentif à ce que ce travail soit réalisé dans un cadre agréable, et d'avoir fait preuve d'une grande compréhension pour que je bénéficie de conditions optimales en termes d'efficacité pendant la rédaction. Merci d'avoir permis que ce projet s'inscrive dans de nombreuses collaborations, permettant ainsi de multiplier les stratégies et de rendre mes travaux de recherche toujours plus intéressants. Je suis très reconnaissante du soutien dont j'ai pu profiter au sein même de l'équipe, notamment pour assurer la continuité des expériences lors de mes déplacements aux Etats-Unis, et particulièrement Isabelle, qui m'a fait bénéficier de son expertise au laboratoire et avec qui j'ai tout partagé au cours de ces trois années. Merci d'avoir assuré le bon déroulement des multiples choses en cours à d'innombrables reprises, mais aussi pour ta générosité et ton enthousiasme ainsi que l'engouement communicatif dont tu fais preuve dans ton travail, c'était sincèrement un plaisir de pouvoir progresser à tes côtés. Un grand merci à Michel également, qui a consacré du temps à m'apprendre la cristallographie aux rayons X et le traitement des données de diffractions, ainsi que pour les nombreux conseils avisés pour la mise en place de multiples expériences selon une grande rigueur. Merci aussi pour les autres discussions très variées et divertissantes.

Merci à Vincent Chaptal pour avoir gentiment proposé son aide pour travailler sur données de diffractions, et sans qui tout un aspect structural sur la protéine serait probablement resté sans solution. Merci également à Stéphanie Ravaud pour nous avoir mis en contact.

Merci aux thésards et post-docs avec qui j'ai pu lier des amitiés à l'BS et partager de grands moments, plus particulièrement Silvia, Charles, François, Romain L., Laura, Simon, Charline, Orso, Audrey, Justine, Guillaume, et tous ceux que je pourrais oublier. Merci également à tous les autres membres du groupe.

C'était une grande chance de pouvoir réaliser ces travaux sur un sujet qui m'a passionné, et je ne saurais assez remercier toutes les personnes que j'ai côtoyé à l'IBS ou au quotidien pour m'avoir aussi bien entouré.

Enfin, plus personnellement, je ne pourrai jamais assez remercier Romain de m'avoir témoigné un soutien indéfectible pendant les dix dernières années, et pendant toutes mes études quelque soit la difficulté des épreuves à surmonter. Merci d'avoir affronté tout cela à mes côtés, et aussi d'avoir été là pour partager les succès. Merci de m'avoir permis de construire des qualités me permettant d'évoluer avec un immense intérêt dans mon travail et une grande ténacité, en ayant insufflé en moi

cette passion à formuler des hypothèses pour comprendre les mécanismes pouvant expliquer les comportements observés expérimentalement. Merci pour le regard admiratif que tu portes à tout ce que je fais, et qui me permet d'être plus confiante et plus forte. Tu as permis de me révéler selon une meilleure version de moi-même et je suis ravie de grandir chaque jour à tes côtés et de ce je suis devenue grâce à toi. Tu es impressionnant, merci pour ta patience et ta gentillesse.

Je souhaite remercier toute ma famille et mes parents qui m'ont transmis un esprit scientifique ainsi qu'une sensibilité artistique, et m'ont toujours laissé une grande liberté et une grande autonomie, en faisant tout leur possible pour me permettre de m'épanouir avec joie dans divers domaines mobilisant mon intérêt. Merci notamment à Elodie, Coralie et Alex d'avoir témoigné leur intérêt pour mes travaux.

Je souhaiterais également remercier la famille de Romain pour m'avoir encouragé chaleureusement au cours des dernières années et pour toutes l'affection qui m'a été transmise. Merci à Jeanine, Jean-Claude, Arnaud, Capucine, Yann, Valérie, Maud, Lilian et Silvie.

Enfin merci à Clarisse, ma meilleure amie d'enfance, malgré l'éloignement, je suis toujours très heureuse de repenser à nos aventures et histoires épiques. Merci à tes parents, Ghislaine et Claude Bender, qui ont été nos instituteurs et ont toujours fait preuve d'une fierté incommensurable à mon égard. Merci de m'avoir transmis cette curiosité scientifique qui me caractérise, ainsi que la détermination dans la réalisation de ce que j'entreprends.

Pour terminer, je remercie tous mes autres amis, et plus spécialement Marina, Camille, Laurent, Manon, Paulin, Antonio, Pierre, Aurélie, avec qui j'ai partagé d'incroyables instants et qui m'ont accompagné dans la célébration de cet événement.

Préambule

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet Emergence, financé par l'Université Grenoble Alpes en partenariat avec l'université de Kennesaw aux Etats-Unis. Dans ce contexte, une collaboration a été instaurée permettant que certains des travaux présentés dans le manuscrit soit réalisés au sein du laboratoire du Pr. Smith lors de deux déplacements d'un mois aux Etats-Unis.

Partie I : Introduction

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	3
1. L'adaptation à la vie aérobie	3
2. Natures et propriétés des ROS	4
3. Sources des ROS	6
A. La chaîne mitochondriale	6
B. Le réticulum endoplasmique	6
C. Les peroxysomes	7
D. La famille des NADPH oxydases	7
E. La myéloperoxydase.....	8
F. Les sources exogènes de ROS.....	9
4. Effets physiologiques des ROS.....	9
A. Réactivité des ROS avec les protéines et les acides aminés.....	9
a. Les résidus cystéines	10
b. Les résidus méthionines	10
c. Les résidus aromatiques.....	11
B. Peroxydation lipidique	11
C. Dégradation par oxydation de l'ADN	13
5. Prise en charge des ROS	13
A. Systèmes enzymatiques	13
a. Les superoxydes dismutases	13
b. Les catalases	14
c. Les glutathion peroxydases	14
d. Les peroxyredoxines.....	14
B. Systèmes non enzymatiques	14
a. Le glutathion.....	14
b. Les Autres Antioxydants	15
6. Les Rôles des ROS.....	15
A. Théorie des Radicaux libres.....	16
B. Rôle des ROS dans la défense immunitaire.....	16
C. Rôle des ROS comme molécule signal.....	17
a. Réversibilité des signaux redox	17
b. Système de régulation spatiale et temporelle	18
7. Conclusion	19
Les NADPH Oxydases (NOX)	21

1.	Découverte et historique des NADPH oxydases.....	21
2.	Organisation, activation et régulation de la NADPH oxydase phagocytaire	25
A.	NOX2 : prototype des NADPH oxydase	25
B.	Les composants du complexe NADPH oxydase.....	26
a.	Le flavocytochrome b_{558}	26
1.	NOX2.....	26
2.	Le transfert d'électron.....	27
3.	Le partenaire membranaire p22	28
b.	Les composantes cytosoliques	29
1.	Les Facteurs Cytosoliques.....	29
2.	Les protéines G	31
3.	Les mécanismes d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire	32
A.	L'activation	32
B.	Le Priming.....	32
C.	Phosphorylation des sous unités du complexe NADPH oxydase	32
D.	Activation par les lipides et l'acide arachidonique.....	34
4.	Les homologues et isoformes des NOX.....	34
A.	NOX1-NOX3	34
B.	NOX4.....	35
C.	NOX5.....	35
D.	DUOX1/DUOX2.....	36
	Implication des NOX dans les processus	39
1.	Implication dans la défense de l'hôte et l'inflammation.....	39
A.	La phagocytose : Elimination des pathogènes dépendante des ROS.....	39
a.	Dégradation des pathogènes par la cascade de ROS $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/HOCl$	39
b.	Régulation du pH phagosomal	39
B.	Inactivation des facteurs de virulence	40
C.	Limitation de la réponse inflammatoire.....	41
D.	Activation des NET.....	41
2.	Rôle des NADPH oxydase dans la signalisation cellulaire redox	41
A.	Régulation des voies de signalisation.....	42
a.	Inhibition des phosphatases.....	42
b.	Activation des kinases	42
c.	Régulation des ions Calcium.....	42
1.	Canaux calciques membranaires.....	42
2.	Relargage des ions calcium intracellulaires.....	43

3.	Pompes calciques	44
d.	Régulation de la croissance et de la mort cellulaire.....	44
1.	Mort cellulaire	44
2.	La croissance cellulaire	44
e.	Rôle dans les mécanismes de biosynthèse	45
f.	Rôle dans l'angiogenèse	45
1.	L'étape de prolifération.....	45
2.	L'étape de bourgeonnement.....	45
3.	L'étape de migration et de formation de tubules	46
3.	Conclusions.....	47
Pathologies liées à la dérégulation des NOX		49
1.	La granulomatose septique chronique.....	49
2.	Maladies du système nerveux central.....	49
A.	Maladie de Parkinson	50
B.	Maladie d'Alzheimer	51
3.	Cancers	51
A.	Développement des tumeurs.....	52
B.	Prolifération, invasion et métastases	53
C.	Angiogenèse induite par les tumeurs.....	54
4.	Maladies Cardiovasculaires	55
A.	Hypertension	55
B.	Athérosclérose.....	56
C.	Diabète.....	57
5.	Conclusion	58
Données structurales disponibles sur les		59
1.	Données structurales d'homologie avec les FNR	59
2.	Données structurales expérimentales.....	60
A.	Structures des facteurs cytosoliques.....	61
B.	Structure du partenaire p22 ^{phox}	63
C.	Structures du cœur catalytique transmembranaire.....	63
D.	Manque important de données sur la partie membranaire	64
Approche bactérienne pour résoudre la structure		67
1.	Analyses phylogénétiques concernant l'origine des NOX.....	67
A.	Analyses phylogénétiques à partir des séquences de NOX eucaryotes.....	67
B.	Recherches d'homologie sur des protéines plus éloignées des NOX.....	69

a.	Des indices datant de 2004	69
1.	YedZ : le lien avec les organismes bactériens.....	69
2.	Le domaine transmembranaire FRD.....	70
b.	Evolution de la superfamille FRD.....	70
c.	YedZ un système à deux protéines procaryotes fonctionnellement apparentées aux NOX 71	
2.	Découvertes expérimentales des Nox bactériennes.....	72
A.	Découverte de la 1 ^{ère} Nox bactérienne (SpNox).....	72
a.	Identification des Nox procaryotes	72
b.	Sélection et purification de SpNox	74
c.	Preuves expérimentales de l'appartenance à la famille des Nox.....	74
B.	Caractérisation structurale d'une Nox procaryote (CsNox)	75
	Objectifs de la thèse	77

Partie II : Caractérisations structurales et biochimiques

Principes de caractérisations structurales et biochimiques	83
1. Introduction.....	83
2. Les Techniques de Biologie Structurale.....	84
3. Cristallographie aux Rayons X	85
A. Découverte des Rayons X.....	85
B. Principe de diffraction des Rayons X.....	86
C. Diffusion des rayons X à deux électrons.....	86
D. Diffusion des rayons X par un atome	87
a. Diffraction des rayons X par une protéine	88
b. Diffraction des rayons X par un cristal de protéine.....	88
c. Calcul de la densité électronique	89
d. Phasage.....	90
4. Cristallogenèse	93
A. Principe de la cristallogenèse	93
B. Les différentes méthodes de cristallisation	95
a. Diffusion de vapeur	95
b. Phase Cubique Lipidique	96
C. Recherche des conditions de cristallisation	96
a. Criblage.....	96
b. Optimisation.....	97
1. Le scale up	97
2. Variation du ratio protéine/puits	98
3. L'ensemencement	99
4. Stratégies de stabilisation de la protéine	100
5. Contrôle de la température.....	100
c. Difficultés liées aux protéines membranaires.....	101
1. La protéine en tant que variable	101
2. Les détergents	101
5. Le traitement des données.....	102
A. Les principes	102
B. Les programmes utilisés	103
C. La validation des données	103
6. Affinement et construction de la structure.....	104

D.	Les programmes utilisés	104
E.	Cartes de densité électronique	104
F.	Critères d'évaluation du modèle	104
7.	Diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)	105
A.	Principe.....	106
B.	Matching point	106
8.	Caractérisations Biochimiques	107
A.	Thermostabilité	107
a.	Les différentes techniques	108
b.	ThermoFAD.....	108
c.	NanoDSF	109
B.	L'ultracentrifugation analytique (AUC)	109
C.	Activité enzymatique.....	110
a.	Caractérisation de l'Activité cytochrome c réductase de SpNox	110
D.	Analyse spectrale.....	111
a.	Spectre différentiel.....	111
b.	Spectre de la protéine purifiée.....	111
E.	SEC-MALS.....	112
	Méthodes de caractérisation	115
1.	Biologie moléculaire	115
A.	Nomenclature associée aux différentes constructions	115
B.	Clonage du gène de SpNox dans le plasmide d'expression	115
C.	Création des vecteurs des variants de SpNox	115
2.	Biochimie.....	116
A.	Production des protéines recombinantes.....	116
B.	Lyse cellulaire	117
C.	Solubilisation des membranes	117
D.	Purification	117
a.	Constructions issues de SpNox entière (SpNox _{FL}) ou du domaine TM (SpNox _{TM}).....	117
1.	Purification de référence en LMNG.....	117
2.	Purification en HEPES	118
3.	Purification en DDM	118
4.	Purification en DMNG.....	118
b.	Constructions issues du domaine DH de SpNox (SpNox _{DH})	118
1.	Production	118
2.	Purification	118

A.	Caractérisation biochimique	119
a.	Spectre différentiel des membranes SpNox.....	119
b.	Electrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE).....	119
1.	Préparation des échantillons pour SDS-PAGE	119
2.	Migration	119
3.	Révélation.....	119
c.	Western Blot.....	120
d.	Chromatographie sur couche mince	120
e.	Activité enzymatique cytochrome c réductase	120
f.	Détermination des paramètres catalytiques.....	120
g.	Evaluation de la thermostabilité par nanoDSF.....	121
3.	Bioinformatique	121
A.	Alignements de séquences.....	121
B.	Génération du modèle d'homologie	122
4.	Cristallographie aux rayons X	122
A.	Cristallogénèse screen automatique au robot :	122
B.	Cristallogénèse manuelle	122
C.	Traitement des données	123
h.	La ligne de lumière FIP – BM30a	123
i.	Les lignes de lumière ID30a-1/MASSIF-1.....	123

Partie III : Caractérisation structurale de SpNox entière

Optimisation de la thermostabilité et activité de SpNox pour les études structurales	129
1. Caractérisation de la qualité de l'échantillon de SpNox	129
A. Caractérisation de la pureté et de l'homogénéité de SpNox à l'issue de la purification	129
B. Evaluation de l'état d'oligomérisation de SpNox.....	131
C. Etude de la dynamique d'association/dissociation de SpNox.....	133
2. Optimisation de la thermostabilité de SpNox.....	135
A. Mesure de thermostabilité par nanoDSF.....	135
a. Optimisation des conditions de mesures	136
b. Thermostabilité des fractions monomère et dimère de SpNox.....	139
B. Optimisation du détergent.....	139
C. Optimisation des conditions de pH et de sels pour la conservation de SpNox.....	141
a. Optimisation de la stabilité	141
3. Optimisation de l'activité	144
4. Influence du FAD	146
A. Courbe de ratio différentiel obtenu par nanoDSF.....	146
B. Etude par ThermoFAD	148
5. Conclusion	148
Etude cristallographique de SpNox entière.....	151
1. Criblage HTX	151
A. Cristallogénèse	151
B. Analyse des hits de cristallisation.....	152
C. Plaques de criblage affinées.....	153
D. Construction d'un modèle linéaire pour prédire la cristallisation de SpNox	155
E. Caractérisation de la thermostabilité de SpNox en condition de cristallisation	157
2. Optimisation par test de cristallisation manuelle	158
A. Affinement manuel (Scale Up)	158
B. Analyse de l'influence du PEG et des conditions de sels sur la cristallisation de SpNox	159
C. Influence de l'étiquette His-Tag et du FAD (10µM) sur la cristallisation de SpNox	161
D. Diagramme de phase de SpNox à 20°C	162
E. Diffraction des cristaux manuels de SpNox FL	163
3. Stratégies d'amélioration de la qualité de diffraction des cristaux	164
A. Variations des Sels – Echelle de Hofmeister	164
B. Criblage d'Additifs	165
C. Amélioration de la qualité cristalline par ensemencement	168
a. Micro-seeding.....	168

b.	RMMS	169
1.	Thermostabilité en présence de MgCl ₂	170
2.	Test d'activité enzymatique	171
3.	Test de cristallisation en présence de MgCl ₂	172
D.	Récapitulatif des stratégies pour améliorer la diffraction des cristaux de SpNox	173
4.	Mutations Stabilisantes de SpNox.....	173
A.	Choix des mutations	173
B.	Expression et caractérisation des mutants SpNox F397W, F397S, F399W, F399S	174
C.	Cristallisation des mutants SpNox F397W et F397S.....	177
5.	Conclusion	177
	Etude structurale basse résolution de SpNox.....	179

Partie IV : Caractérisation structurale des domaines indépendants de SpNox

Caractérisation biochimique des domaines isolés de SpNox.....	203
1. Introduction sur la production de domaine isolés	203
A. Intérêt de la production par domaine	203
B. Modèle d'homologie	203
a. Alignements multiples de séquences d'homologues de NOX.....	203
b. Modèles d'homologies des domaines indépendants de SpNox	204
c. Modèle d'homologie de SpNox sous forme entière	205
2. Production des domaines TM et DH de SpNox	206
A. Expression.....	206
B. Caractérisation spectrale.....	206
C. Purification	207
a. Caractérisation des purifications sur gels Acrylamide	207
b. Caractérisation de l'intégrité des domaines.....	208
c. Vérification du repliement du domaine DH	210
3. Thermostabilité des domaines DH et TM isolés.....	212
A. Optimisation des concentrations des domaines isolés pour le nanoDSF	212
B. Optimisation de la thermostabilité des domaines isolés de SpNox.....	213
a. Comparaison aux profils de thermostabilité de SpNox WT	213
b. Optimisation de la concentration de MgCl ₂	214
c. Thermostabilité sur un mélange TM+DH	215
d. Quantification du détergent autour de SpNox WT et SpNox _{TM}	216
4. Caractérisation du mutant W289F	217
A. Expression et purification de SpNox W289F	217
a. Expression du SpNox W289F	217
b. Purification de SpNox W289F.....	218
c. Caractérisation de l'activité cytochrome c réductase de SpNox.....	219
B. Etude de la thermostabilité du mutant SpNox W289F	220
a. Optimisation de la concentration de SpNox W289F pour le nanoDSF.....	220
b. Thermostabilité de W289F en présence d'additif.....	221
5. Conclusion	221
Caractérisation structurale des domaines isolés de SpNox.....	223
1. Essai de cristallogénèse sur les domaines indépendants de SpNox.....	223
A. Construction SpNox _{TM} – Domaine TM.....	223
B. Construction SpNox _{DH} – Domaine DH.....	224
a. Criblage HTX	224

b.	Tentative de remplacement moléculaire	225
c.	Détermination des phases des cristaux.....	227
2.	Résolution des structures de SpNox _{DH} F397W et SpNox _{DH} WT	228
A.	Structure de SpNox _{DH} F397W	228
B.	Structure de SpNox _{DH} WT	230
C.	Analyses préliminaires des structures de SpNox _{DH} WT et F397W.....	231
3.	Conclusion	234

Partie V : Etude structure fonction

Etude structure fonction de SpNox.....	239
1. Mécanisme d'ouverture/fermeture du site de liaison au NADPH régulant l'activité oxydase	239
A. Analyse structurale.....	239
B. Mesure d'affinité pour le NADPH et le NADH	241
2. Possible implication des résidu Y ₃₅₃ et W ₂₈₉ pour l'activité enzymatique	243
A. Implication du résidu Y353 dans la liaison au NADPH.....	243
B. Implication du résidu W ₂₈₉ pour la liaison du NADPH	244
3. Interaction du cofacteur FAD avec les domaines DH et TM de SpNox	245
A. Caractérisation des paramètres enzymatiques de SpNox _{FL} et SpNox _{DH}	245
B. Caractérisation des interactions du FAD avec le TM.....	246
4. Etude de l'interface entre les domaines TM et DH	250
A. Complémentarité des interfaces de contact.....	250
B. Mécanismes possibles d'interactions entre les domaines de SpNox.....	250
5. Conclusion	252
Modularité de SpNox et chimères	253
1. Evaluation de la modularité de SpNox par cinétique spectrale	253
A. Tests préliminaires sur SpNox WT sous forme entière	253
B. Etude du transfert d'électrons du domaine DH vers le domaine TM	255
C. Mesure d'affinité pour le NADH du système TM+DH	258
2. Conception de Nox chimériques humanisées pour l'étude du transfert d'électron	259
A. Introduction.....	259
B. Conception de chimères de 1 ^{ère} génération.....	259

Partie VI : Ouverture et Conclusion générale

Résolution de la structure cristallographique basse résolution de SpNox sous forme entière.....	271
1. Mise en évidence de l'anisotropie des cristaux de SpNox sous forme entière.....	271
A. Observation de l'anisotropie des cristaux de SpNox.....	271
B. Origine de l'anisotropie de diffraction au sein des cristaux.....	272
C. Impact de l'anisotropie sur le traitement des jeux de données	273
2. Résolution de la structure cristallographique basse résolution de SpNox	273
A. Traitements des jeux de données anisotropes du serveur STARANISO.....	273
a. Présentation des serveurs	273
b. Traitement des jeux de données.....	274
B. Remplacement moléculaire et affinement de la structure de SpNox sous forme entière .	275
a. Remplacement moléculaire	275
3. Conclusion	280
Conclusion générale	281

Partie VII : Bibliographie

Bibliographie Partie I - Introduction.....	289
Bibliographie Partie II - Techniques de caractérisation structurales et biochimiques de SpNox.....	313
Bibliographie Partie III – Caractérisation structurale de SpNox entière	319
Bibliographie Partie IV – Caractérisation structurale des domaines indépendants de SpNox	321
Bibliographie Partie V – Etude structure fonction	325
Bibliographie Partie VI – Ouverture et Conclusion générale.....	327

Partie VIII : Annexes

Fiches plasmides.....	333
Informations supplémentaires de l'article	341
Communications scientifiques	347

Abbréviations

³O₂ ou O₂	Oxygène moléculaire
2Fo-Fc	Carte de densité électronique qui peut être considérée comme la densité électronique de la molécule à résoudre
6-OHDA	6-hydroxydopamine, neurotoxine permettant d'invalider sélectivement les neurones dopaminergiques et noradrénergiques
AA	Acide Arachidonique
AA	Acide Ascorbique
a.a.	Acides Aminés
abc	Vecteurs de la maille cristalline
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP/ATP	Adénosine DiPhosphate/Adénosine TriPhosphate
AIR	AutoInhibitory Region, Région Auto-Inhibitrice flanquante C-ter de la région auto-inhibitrice du tandem de SH3 de p47 ^{phox}
ANI	Anisotropie
ARN	Acide ribonucléique
AT1	Angiotensine 1
ATM kinase	Ataxia-Telangiectasia Mutated kinase, protéine activatrice de la réponse aux dommages double-brins à l'ADN
AUC	Analytical UltraCentrifugation, ultracentrifugation analytique
BCA	Acide bicinchoninique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP4	Bone Morphogenic Protein 4, Protéine morphogénétique osseuse 4
C41-DE3	Souche mutante d' <i>E.coli</i> optimisée pour l'expression des protéines membranaires
CaN	Calcineurine B
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur Couche mince
CGD	Chronic granulomatous disease, granulomatose septique chronique
CGDAR	Formes autosomiques récessives de CGD
CGDX⁺	Syndrome CGD induisant une absence totale d'activité NADPH oxydase
CGDX⁺	Phénotype CGD caractérisé par une production normale de protéine gp91 ^{phox} mutée mais inactive
CLR	C-type Lectin Receptor, récepteurs aux lectines de type-C
CMC	Concentration Micellaire Critique
Cryo-EM	Cryo-Electron Microscopy, Cryo microscopie électronique
cSrc	Protéine tyrosine-protéine kinase Src c codée par le proto-oncogène <i>cSrc</i>
C-ter	extrémité carboxyterminale d'un peptide ou d'une protéine
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern, Motif moléculaire associé aux dégâts
D_{ano}	Différence anormale
DDM	n-Dodecyl β-D-maltoside ou Lauryl-β-D-maltoside
DH	Dehydrogenase Domain, Domaine Déshydrogénase

DsbD	Disulfide bond oxidoreductase D, Oxydoréductase de thiols-disulfures
DMNG	Decyl Maltose Neopentyl Glycol
DNase	Désoxyribonucléase
DO	Densité Optique
DPI	Diphenylene iodonium
DSF	Spectroscopie de fluorescence différentielle à balayage
DUOX	Dual oxidase, isoforme de NADPH oxydase
EGF	Epidermal Growth Factor, Facteur de croissance Epidermique
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E, facteur d'initiation eucaryote E4
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
eNOS	eukaryotic Nitric Oxyd Synthase, Oxyde nitrique synthase endothéliale
ERO-1	Endoplasmic xidoreductin-1, oxydoréductine-1 du réticulum endoplasmique
ESRF	European Radiation Synchrotron Facility
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FAD/FADH₂	Forme oxydée/réduite du Flavine Adenine Dinucleotide
FAD⁺/FADH	Forme oxydée/réduite du Flavine Adenine Dinucleotide
FCSS	Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence
F_D	Facteur de dilution
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2, Facteur de croissance 2 des fibroblastes
FL	Full Length, protéine entière
fMLF	Peptide bactérien N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine
FMN	Flavine Mono Nucléotide
FNR	Ferrédoxine-NADP ⁺ Réductases
Fo-Fc	Carte de densité résiduelle qui permet de mettre en évidence les différences entre la densité du modèle et celle observée
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching, Redistribution de fluorescence après photoblanchiment
FRD	Ferric Reductase Domain
Fre	Ferric reductase, Ferrique réductase procaryote
FRE	Ferric reductase, Ferrique réductase eucaryote
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer , Transfert d'énergie par résonance de type Förster entre molécules Fluorescentes
FT	Flow Trough, protéines en interaction non spécifique non retenues par une colonne de chromatographie lors d'un lavage avec le tampon de chargement
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating, Facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GDP/GTP	Guanose DiPhosphate/Guanosine TriPhosphate
GEF	Guanosine Exchange Factor, Facteur d'échange de nucléotides guanylique
GF	Growth Factor, Facteur de croissance
GFR	Growth Factor Receptor, Récepteur aux facteurs de croissance
gp91^{phox}	Sous-unité catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire NOX2, chaîne lourde du cytochrome <i>b</i> codée par le gène CYBB
Grx	Glutarédoxines
GSH	R-S-S-GSH, γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine, glutathion sous forme réduite
GTPase	Enzyme catalysant l'hydrolyse du GTP en GDP
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène

HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HET-SOFAST	Fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains
HIR	Modèle de souris hypertensive
His-tag	Etiquette polyhistidine
hit	Terme spécifique aux expériences de cristallisation qui signifie l'obtention d'un résultat positif
<i>hkl</i>	Famille de plan <i>hkl</i> en condition de diffraction
hNOX	Nox humaines
HO-1	Hème oxygenase-1
HP	Haute pression
Hsat	Champ magnétique de saturation
I/σ	Rapport signal sur bruit
I3C	acide 5-Amino-2,4,6-triiodo isophthalique
IBS	Institut de Biologie Structurale
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
K181	Deshydrogenase Domain, Domaine Déshydrogénase de SpNox
kDa	kilo Dalton
K_m	Constante Affinité (M)
K_mM/K_mWT	Ratio entre l'affinité d'un mutant et l'affinité de la protéine sauvage pour la molécule considérée
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, petite GTPase impliquée dans la genèse de cancers codé par l'oncogène du sarcome de rat Kirsten
LB	Lysogeny Broth, milieu Luria-Bertani
LCP	Lipid Phase Cristallisation, Cristallisation en phase cubique lipidique
LDL	Low Density Lipid, Lipide de faible densité
Li₂SO₄	Lithium Sulfate
LMNG	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
λ_{NOE}	Parmètre d'évaluation des effets NOE
LPS	Lipopolysaccharide
MAD	Multiple wavelength Anomale Diffusion, Diffusion anormale multiple
MAFFT	Multiple Alignment using Fast Fourier Transform, Alignements multiples basé sur l'utilisation de la transformée de Fourier
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase,
MD	Dynamique moléculaire
MgCl₂	Chlorure de magnésium
MIR	Multiple Isomorphous Replacement, Remplacement isomorphe multiple
MM	Masse Molaire
MMO	Monooxygénase microsomale
MMR	Macrophage Mannose Receptor, Récepteur au mannose des macrophage
MPO	Myéloperoxydase
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MR	Molecular Replacement, Remplacement moléculaire
NaCl	Chlorure de sodium
NAD(P)⁺/NAD(P)H	Forme oxydée/réduite du Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate)

NAD(P)H/NAD(P)H₂	Forme oxydée/réduite du Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate)
NanoDSF	Nano Differential Scanning Fluorimetry
NET	Neutrophil Extracellular Traps, réseau de fibres extracellulaires aux neutrophiles
NF-κb	Nuclear Factor-κ B, facteur de transcription-k B
NIS	NOX Insertion Sequence, Séquence d'Insertion de la NADPH oxydase, régule l'entré de NADPH dans la cavité contenant les sites de liaison au NADPH et FAD dans le domaine déhydrogénase
NOE	Nuclear Overhauser Effect, Effet Overhauser nucléaire
NOS	Nitric Oxide Synthase, Oxyde Nitrique Synthase
NOX	NADPH oxydase eurayote
Nox	Homologue procaryote de la NADPH oxydase
NOX2	NADPH oxydase phagocytaire
NOXA1	NADPH oxidase activator 1, Sous-unité cytosolique activatrice isoforme de p67 ^{phox}
NOXO1	NADPH oxidase organizer 1, Sous-unité cytosolique activatrice isoforme de p67 ^{phox}
NTA	Nitrilotriacetic acid, acide nitrilotriacétique
N-ter	extrémité aminoterminal d'un peptide ou d'une protéine
O₂⁻	Anion superoxyde
OsRBOH	Homologue de RBOH de riz (<i>Oryza sativa</i>)
ox-LDL	Oxidized Low Density Lipid, Lipid de faible densité oxydé
p22^{phox}	Partenaire membranaire de NOX2, chaîne lourde du cytochrome b codée par le gène <i>CYBA</i>
p40^{phox}	Sous-unité cytosolique du complexe NADPH oxydase codée par le gène <i>NCF4</i> (Neutrophilic Cytosolic Factor 4)
p47^{phox}	Sous-unité cytosolique organisatrice du complexe NADPH oxydase codée par le gène <i>NCF1</i> (Neutrophilic Cytosolic Factor 1)
p60^{phox}	Sous unité cytosolique du complexe NADPH oxydase
p67^{phox}	Sous-unité cytosolique activatrice du complexe NADPH oxydase codée par le gène <i>NCF2</i> (Neutrophilic Cytosolic Factor 2)
PAF	Platelet Activating Factor, Facteur d'activation plaquettaire
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern, Motif moléculaire associé aux pathogènes
PDB	Protein Data Bank
PDI	Protéine Disulfure Isomérase
PGDF	Platelet Derived Growth Factor, Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGE2	Prostaglandine E2
pH	potentiel Hydrogène
Phox	Phagocyte oxidase, en référence à la NADPH oxydase phagocytaire
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
pKa	Constante d'acidité
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLA2	Phosholipase A2

Poldip2	Polymerase- δ Interacting Protein 2
Poldip2	Polymerase- δ Interacting Protein 2, Protéine 2 interagissant avec la polymérase- δ
Pool SN	Pool SpNox, fractions sélectionnées et regroupées lors d'une étape de chromatographie
PPARα	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α , Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
PPII	Hélice Polyproline de type II
PRR	Pattern Recognition Receptor, récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PRR	Prolin Rich Region, Région Riche en Prolines
psi	Pound-force per Square Inch, Force en livres par pouce carré
π-stacking	Interaction entre les orbitales π de deux molécules différentes
PTP	ProtéineTyrosine Phosphatase
R	Facteur R
Rac	Rac représente une sous-famille de la famille des Rho GTPase
Rap1a	Ras-related protein 1A, Protéine 1A apparentée à Ras, induit le retour morphologique d'une lignée cellulaire transformée par un oncogène Rac
RBOH	Respiratory Burst Oxidase Homolog, équivalent d'une NOX chez les plantes
RE	Reticulum Endoplasmique
RES	Reactive Electrophile Species, espèces réactives électrophiles
R_{free}	Facteur R calculé sur le set de réflexion n'ayant pas subit d'affinement
RhoGDI	Rho GDP-dissociation inhibitor, inhibiteur de dissociation de Rho-GDP
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rmsd	Root mean square deviation, Déviation de la racine de la moyenne des carrés
RNS	Reactive Nitrogen Species, espèces réactives de l'azote
ROS	Reactive Oxygen Species, espèces réactives de l'oxygène
rpm	Rotation par minute
RSS	Reactive Sulphur Species, espèces réactives du soufre
RyR	Récepteurs de la ryadonine
SAD	Single wavelength Anomalous Dispersion, Diffusion anormale à une seule longueur d'onde
SANS	Small Angle Neutron Scattering, Diffusion des neutrons aux petits angles
SAXS	Small Agnle X-ray Scattering, Diffusion des rayons X aux petits angles
SDF-1	Stromal-Derived Factor-1, Facteur-1 dérivé des cellules stromales, protéine chimiokine de type CXC
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Electrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
SEC-MALLS	Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Laser Light Scattering, Chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion de lumière multi-angles
SH3	SRC Homogy 3
siARN	Small interfering RNA, Petit ARN interférent
SIR	Single Isomorphous Replacement, Remplacement isomorphe unique
SIRT1	Sirtuin1
SN	SpNox
SOC	Store Operated Ca ²⁺ Channels, canaux calciques

SOCE	Store Operated Calcium Entry, canaux calciques activés par libération de Ca ²⁺
SOD	Superoxyde dismutase
SpNox	NADPH oxydase bactérienne issue de <i>Streptococcus pneumoniae</i>
SpNox_{180Stop}	Similaire à SpNox _{TM} , construction correspondant au domaine TM de SpNox (N-ter M1-Q180) sous forme isolée
SpNox_{DH}	Construction tronquée de SpNox correspondant au domaine déshydrogénase isolé, correspondant aux résidus M1-Q180 N-terminaux de SpNox
SpNox_{FL}	NADPH oxydase bactérienne issue de <i>Streptococcus pneumoniae</i> sous forme entière
SpNox_{TM}	Construction tronquée de SpNox correspondant au domaine transmembranaire isolé, correspondant aux résidus K181-K400 C-terminaux de SpNox
STEAP	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate
STIM	Stromal Interaction Molecule, molécule d'interaction stromale 1
Tag	Température d'agrégation
TB	Terrific Broth, milieu de culture TB de Gottsacker
TGFβ1	Transforming-Growth-Factor-β1, Facteur de croissance Transformant β1
ThermoFAD	Thermofluor [®] -adapted flavin ad hoc detection system, technique de mesure de la thermostabilité adaptée aux flavoprotéines
Tks4	SH3PXD2B, protéine adaptatrice membre de la superfamille de sous-unité cytosoliques organisatrices de p47phox
Tks5	SH3PXD2A, protéine adaptatrice membre de la superfamille de sous-unité cytosoliques organisatrices de p47phox
TLR	Toll-Like Receptor, Récepteur de type Toll
TM	Transmembrane Domain, Domaine transmembranaire
TM	Domaine Transmembranaire
Tm	Température de fusion à laquelle intervient la demie-dénaturation d'une biomolécule
TNFα	Tumor Necrosis α, Factor Facteur de Nécrose Tumorale α
TPR	Motif Tétratricopeptide
TRAIL	Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRP	Transient Receptor Potential, Canaux potentiel transitoire
Trx	Thioredoxines disulphide reductases, Ferrédoxine:thiorédoxine réductase
VGEF	Vascular Endothelial Growth Factor, Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
Vi	Vitesse enzymatique initiale
Vm	Vitesse enzymatique maximale
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells, Cellules musculaires lisses vasculaires
WT	Wild Type, de type naturel, protéine sauvage
X91⁺-CGD	Similaire à CGDX ⁺ , Phénotype CGD caractérisé par une production normale de protéine gp91phox mutée mais inactive

INTRODUCTION

I

1

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

1. L'adaptation à la vie aérobie

L'introduction et l'accumulation de l'oxygène moléculaire dans les océans anciens et l'atmosphère par les cyanobactéries, il y a 2,2 Milliards d'années, a conduit à la modification de l'environnement terrestre primordial hautement réducteur dans lequel avaient jusqu'à lors évolué les premières formes de vie, le rendant graduellement oxydant.

Dans ces conditions, les organismes, initialement unicellulaires, ont dû développer des mécanismes permettant l'utilisation et la consommation de l'oxygène, indispensable à la production d'énergie pour toute forme de vie aérobie et préalablement nécessaire à l'acquisition d'un niveau supérieur de complexité pour évoluer et proliférer [1].

Cette production d'énergie sous forme d'ATP est réalisée lors de la phosphorylation oxydative par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries.

L'assimilation de l'oxygène au métabolisme des organismes représente cependant un dilemme résidant dans le paradoxe de l'impossibilité de l'existence des organismes eucaryotes supérieurs en absence d'oxygène, or celui-ci est intrinsèquement dangereux pour leur survie. En effet, chaque atome d'oxygène présente sur sa couche externe deux électrons célibataires (Fig.1.1.1) non appariés, chacun pouvant être complété par un autre électron. L'oxygène moléculaire O_2 , contient 2 électrons non appariés sur sa couche de valence, caractérisant ainsi cette espèce de biradical libre. Cependant, en raison de la barrière cinétique résultant de la localisation des électrons non appariés dans l'état spins parallèles au niveau des orbitales π [2], la réactivité de l' O_2 est limitée.

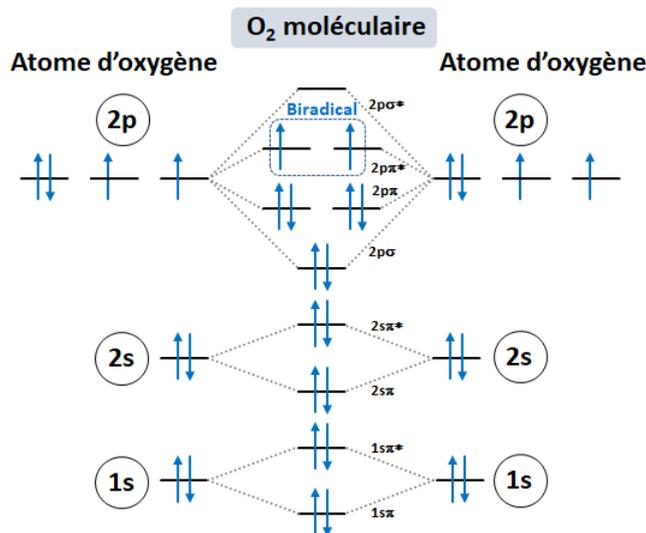


Fig.1.1.1 : Diagramme d'orbitales moléculaires du dioxygène. L'oxygène moléculaire O_2 , composé de deux atomes d'oxygène comporte, sur sa couche de valence, deux électrons libres non appariés, conférant à cette espèce son caractère biradicalaire.

La réduction monoélectronique non programmée de l'oxygène est favorisée par le contexte cellulaire réducteur et conduit ainsi généralement à la formation d'intermédiaires réactifs, ou espèces réactives de l'oxygène, qui constituent, malgré leur toxicité, une contrepartie intrinsèque à la vie en condition aérobie [1].

L'adaptation à la vie en présence d'oxygène a donc nécessité l'évolution simultanée d'une sélection de défenses antioxydantes pour faire face à l'oxygène et ses intermédiaires réactionnels dont les caractéristiques font l'objet de cette partie.

2. Natures et propriétés des ROS

Le processus de réduction de l'oxygène, au cœur de nombreux mécanismes physiologiques, est à l'origine d'intermédiaires réactionnels de courte durée de vie ainsi que de produits de réaction plus stables, regroupés sous le terme générique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) introduit en 1977 [3].

L'oxygène moléculaire (O_2) comporte sur sa couche de valence deux électrons libres non appariés empêchant toute réaction avec les molécules organiques, en revanche, la réduction de l'oxygène par les métaux, catalysée ou non par une enzyme, permet un transfert monoélectronique aboutissant à la production subséquente d'espèces oxydantes non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux (HOCl) ou de radicaux libres, tels que l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou le radical hydroxyle ($\bullet OH$), dont l'unique électron non apparié sur la couche périphérique permet une réactivité élevée avec les systèmes biologiques (Tab.1.1.1 & Fig.1.1.2) [4].

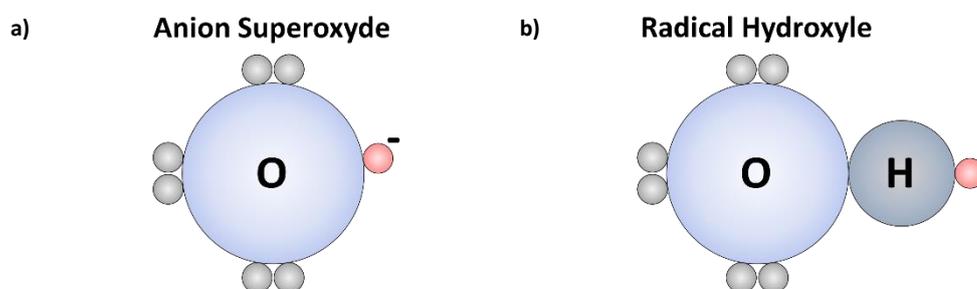
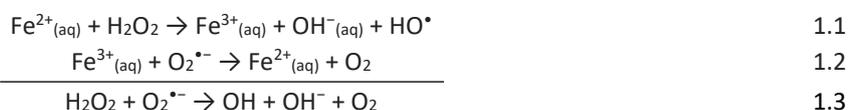


Fig.1.1.2 : Electrons sur la couche de valence des radicaux de la famille des ROS. (a) Anion superoxyde, (b) Radical hydroxyle. Le point rouge représente l'électron non apparié.

La production de ROS est réalisée selon une cascade de réaction débutant par la formation d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) (Fig.1.1.3) [5], possédant une longue demi-vie mais une faible réactivité (Tab.1.1.1). L'anion superoxyde représente la majorité des radicaux libres synthétisés par les processus enzymatiques. La dismutation de l'anion superoxyde, incapable de diffuser librement à travers les bicouches lipidiques [6], est catalysée par la superoxyde dismutase et permet la formation d' H_2O_2 , qui en présence de Fer, réagit avec l'anion superoxyde pour aboutir à la production de radicaux hydroxyles (Eq.1.3) [7] par l'intermédiaire des réactions de Fenton (Eq.1.1) et Haber-Weiss (Eq.1.2).



L' H_2O_2 peut également être converti par voie enzymatique en acide hypochloreux, un oxydant très puissant et relativement stable capable de traverser les membranes pour cibler les lipides et les protéines [8].

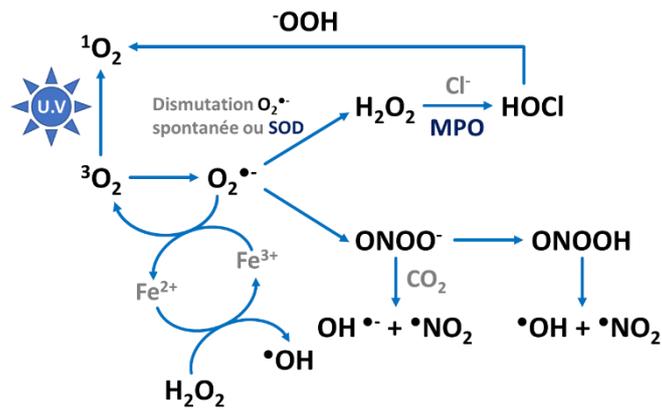


Fig.1.1.3 : Voies de métabolisation des différentes espèces réactives de l'oxygène. L'oxygène moléculaire ($^3\text{O}_2$) est initialement réduit en anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) qui est ensuite converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). La réaction du peroxyde d'hydrogène avec un ion Cl^- entraîne la formation d'acide hypochloreux HOCl. Adapté de [9].

Les radicaux hydroxyles HO^\bullet possèdent une faible durée de vie (10^{-9}s) et ne peuvent pas franchir les membranes. En revanche, ils présentent la plus haute réactivité parmi les ROS en raison de leur potentiel oxydant très élevé et possèdent notamment la capacité d'initier l'oxydation en chaîne des lipides. Cette lipoperoxydation conduit à la formation de nouvelles espèces réactives, les RES (espèces réactives électrophiles (ROO^\bullet)), pouvant réagir à leur tour avec les systèmes biologiques [9]. L'anion superoxyde peut également intervenir dans des réactions avec les composés azotés et soufrés pour conduire à la formation respective d'espèces réactives de l'azote (RNS) tel que le peroxynitrite (ONOO^-) par réaction avec l'oxyde nitrique (NO^\bullet) et d'espèces réactives du soufre (RSS) dont la réactivité est proche de celle des ROS [10].

Nom	Réactivité	Temps de $\frac{1}{2}$ vie	Distance de diffusion	Diffusion à travers les membranes	Cibles privilégiées
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Faible	10^{-3}s	$10^{-3} - 10^{-2}\mu\text{m}$	Non	Résidus Cystéines, Centre Fe-S
HOCl	Elevée	$10^1 - 10^2\text{s}$	$10^{-1}\mu\text{m}$	Oui	Acides gras, protéines, fonctions amines
H_2O_2	Elevée	$10^{-6} - 10^{-3}\text{s}$	$1\mu\text{m}$	Oui	Résidus Cystéines
OH^\bullet	Très Elevée	10^{-9}s	$10^{-3}\mu\text{m}$	Non	Tous les substrats biologiques
NO^\bullet	Elevée	1s		Oui	Protéines
ONOO^-	Elevée	$\sim 10^{-6}\text{s}$		Oui	Thiols, Acides gras
ROO^\bullet	Moyenne				Acides gras

Tab.1.1.1 : Caractéristiques de différentes espèces réactives de l'oxygène [11].

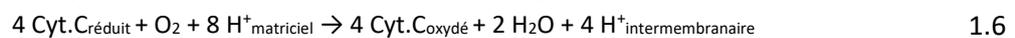
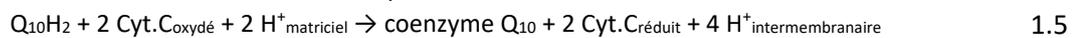
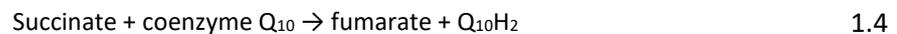
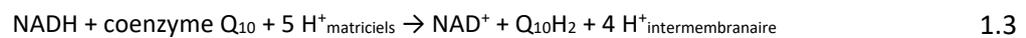
Ainsi, parmi les ROS majoritaires, le HO^\bullet possède la plus haute capacité d'oxydation des substrats biologiques et réagit instantanément de façon non sélective. Malgré son incapacité à franchir les membranes ainsi que sa présence à faible concentration physiologique (10^{-10}M), le radical hydroxyle est très instable et constitue ainsi le ROS le plus toxique au niveau cellulaire. L'acide hypochloreux présente également un fort pouvoir d'oxydation des composants cellulaires car il associe une réactivité élevée, une stabilité importante ainsi qu'une facilité à pénétrer les membranes biologiques. L' H_2O_2 présente des caractéristiques relativement similaires à l'HOCl mais le réel danger du peroxyde d'hydrogène réside dans sa capacité, en présence de traces métalliques, à former à travers la réaction de Fenton l'anion hydroxyle loin de son site de production grâce à la stabilité et les propriétés de diffusion élevée de celui-ci. L'incapacité de diffusion de l'anion superoxyde confère à celui-ci une localisation restreinte aux compartiments cellulaires dans lesquels il est maintenu à faible concentration (10^{-11}M). Parmi les espèces azotées, le peroxynitrite est hautement toxique et peut

diffuser librement à travers les membranes [12]. Ce dernier réagit spontanément avec le CO₂ pour former le radical nitroso-peroxo-carboxylate (ONOOCO₂⁻) à fort potentiel oxydant.

3. Sources des ROS

A. La chaîne mitochondriale

La mitochondrie est un organe intracellulaire ubiquitaire spécialisé dans la production d'énergie sous forme d'ATP indispensable aux fonctions cellulaires [13]. Celle-ci débute dans le cytoplasme par l'oxydation complète du glucose et fournit deux électrons transmis aux cofacteurs Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺) conduisant à la formation de NADH₂. Le processus se poursuit par l'intermédiaire du cycle de Krebs qui permet la réduction dans la mitochondrie du FAD en FADH₂. Les électrons sont ensuite transférés à la chaîne respiratoire (Fig.1.1.4) au niveau des complexes I et II, une NADH déshydrogénase et une succinate déshydrogénase catalysant respectivement les réactions 1.3 et 1.4.



Le transfert se poursuit vers le coenzyme Q₁₀, le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c réductase) puis le cytochrome c par l'intermédiaire de réactions successives d'oxydoréduction (Eq.1.5 et 1.6) jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Lors de ce processus, en cas de réduction incomplète de l'oxygène dans les réactions 1.3, 1.4, 1.5 et 1.6, des fuites métaboliques peuvent survenir conduisant à un relargage extra-mitochondrial accidentel de ROS, à travers les complexes I, II et III [14] contribuant largement à la production d'anions superoxydes, ensuite dismutés en H₂O₂. Ainsi dans les organismes aérobies, la mitochondrie représente la source majeure de ROS [15] en raison du rôle central de la respiration pour la survie de ceux-ci.

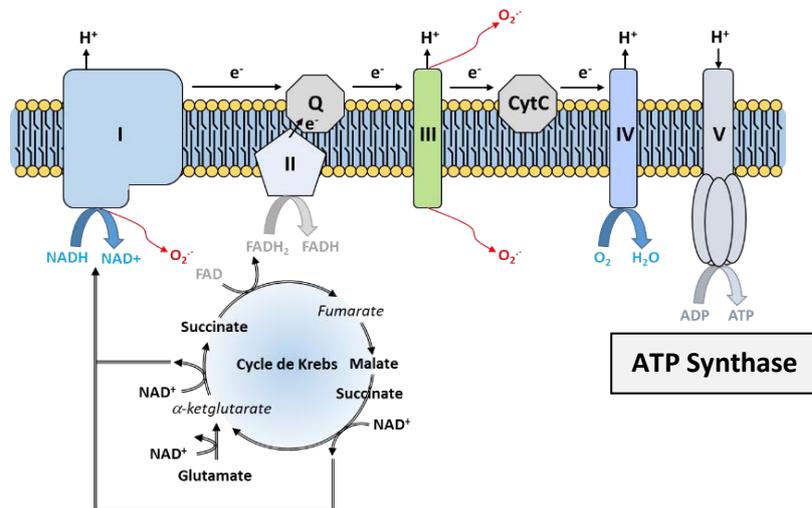


Fig.1.1.4 : Génération de ROS au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Les complexes I et III sont les principales sources d'O₂⁻. Le cofacteur NADPH cède deux électrons au FMN du complexe I au niveau de la membrane de la mitochondrie initiant ainsi la production d'O₂⁻.

B. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) constitue le site de maturation des protéines permettant la réalisation des modifications post-traductionnelles, le repliement et la translocation inter-organites de celles-ci. L'acquisition de la structure tertiaire des protéines est réalisée par la formation de ponts

disulfures entre les résidus cystéines grâce à l'oxydation de ceux-ci par la protéine disulfure isomérase (PDI). La régénération de la PDI par l'oxydoréductase-1 du réticulum (ERO-1) conduit au transfert d'électrons de la PDI à l'oxygène comme accepteur final d'électrons [16], au cours duquel est ainsi généré du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Fig.1.1.5). Les monoxygénases microsomaux (MMO) sont des complexes enzymatiques comportant un cytochrome P450 responsable d'une production importante d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène dans le réticulum endoplasmique [9].

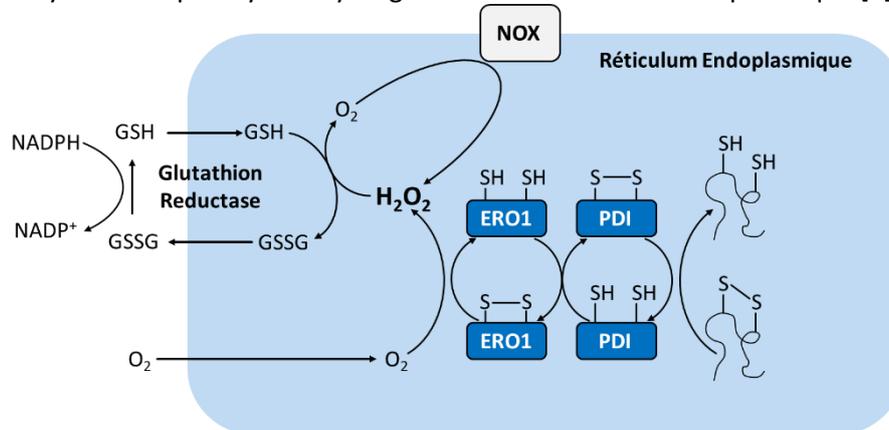


Fig.1.1.5 : Schéma descriptif de la production de ROS au niveau du réticulum endoplasmique. La régénération de la PDI par l'oxydoréductase-1 du réticulum (ERO-1) conduit au transfert d'électrons de la PDI à l'oxygène générant ainsi l' H_2O_2

C. Les peroxysomes

Les peroxysomes sont des vésicules ubiquitaires dépourvues d'ADN ou de ribosomes présentant une membrane composée d'une simple bicouche lipidique, dont la fonction principale est la détoxification cellulaire grâce à un processus de β -oxydation permettant la dégradation de molécules telles que les alcools et acides gras, à l'origine de la source principale d' H_2O_2 au sein des peroxysomes.

Des anions superoxydes sont également produits au niveau de la matrice peroxysomale par des oxydases telles que la xanthine oxydase, responsable de la production de H_2O_2 et de $O_2^{\bullet-}$, ainsi qu'au sein d'une chaîne de transport d'électrons de la membrane peroxysomale impliquant une NADH ferrocyanure réductase et un cytochrome *b*, où trois polypeptides membranaires ont été identifiés comme sources de $O_2^{\bullet-}$ [17].

L' H_2O_2 et le $O_2^{\bullet-}$ selon un mécanisme de Haber-Weiss pourraient également être à l'origine de 1O_2 , dont la production au sein des peroxysomes a également été rapportée.

D. La famille des NADPH oxydases

Les nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases ou NOX constituent une famille de plusieurs isoformes (NOX1-5, DUOX1-2) de flavoprotéines membranaires intégrales exprimées dans une large variété de cellules et tissus chez les mammifères, et spécialisées dans le transfert d'électrons à travers les membranes biologiques pour générer des espèces réactives de l'oxygène [18].

Alors que les ROS sont généralement accidentellement formés par pertes métaboliques résultantes de l'activité fonctionnelle normale d'ensembles enzymatiques, l'activité des NOX est dédiée à la production de ROS biologiquement actifs occupant des rôles importants dans des processus divers tels que la défense immunitaire, la signalisation, la morphogénèse ou le développement. Les NOX sont ainsi considérées comme le système majeur producteur de ROS dans les cellules mammifères et constituent le seul système réalisant cette fonction de manière professionnelle [19].

Elles catalysent la réduction NADPH-dépendante de l'oxygène moléculaire pour la production d'anions superoxydes $O_2^{\bullet-}$ (NOX1-3, NOX5) ou directement d' H_2O_2 , (NOX4, DUOX1-2) en transférant séquentiellement les électrons un par un du NADPH cytosolique au cofacteur FAD lié au sein de l'enzyme de manière non-covalente, puis aux groupements prosthétiques, respectivement l'hème

proximal face cytosolique et l'hème distal en face externe de la membrane, pour aboutir à la réduction de l'O₂ extracellulaire qui constitue l'accepteur final.

L'O₂^{•-} ainsi produit est ensuite rapidement converti en H₂O₂ par dismutation spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) (Fig.1.1.6) conduisant, à travers une cascade de réactions, à la formation de ROS secondaires, incluant le peroxynitrite issu de la réaction de l'O₂^{•-} avec l'oxyde nitrique, le radical hydroxyle issu de la réaction de Fenton et l'acide hypochloreux HOCl catalysé par une peroxydase [19].

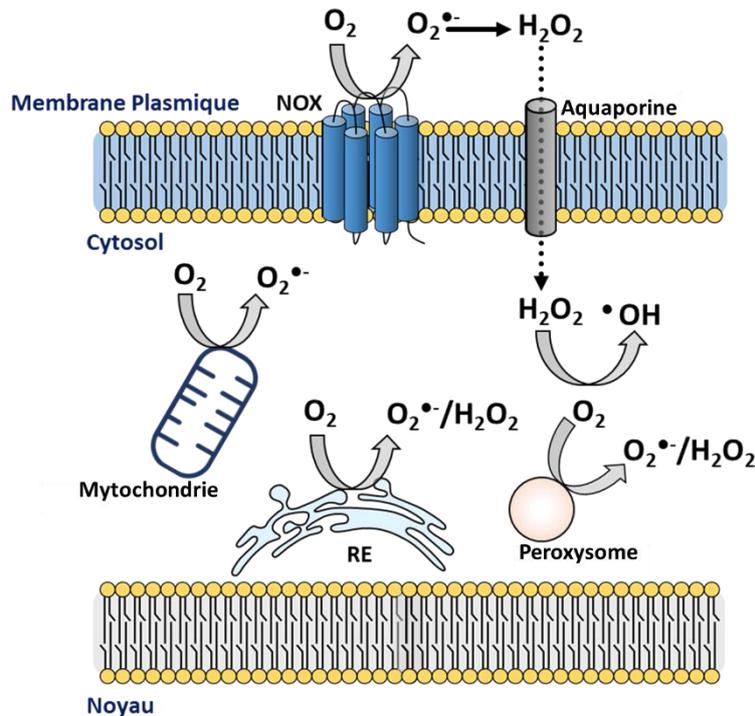


Fig.1.1.6 : Principales sources de production des ROS au niveau cellulaire. Les NOX et les mitochondries sont les principales responsables de la production d'O₂^{•-}. D'autres compartiments cellulaires, tels que le RE ainsi que le peroxysome peuvent générer de l'H₂O₂ en plus de l'O₂^{•-}. Adapté de [9].

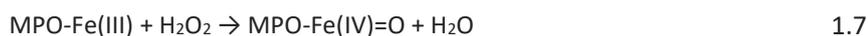
Depuis l'identification en 1961 de la première NADPH oxydase [20] au sein des membranes des cellules phagocytaires, le rôle initial attribué à la production de ROS dans l'immunité est longtemps resté limité à la destruction des pathogènes par les cellules immunitaires lors de la phagocytose.

Plus récemment, le rôle des ROS produits par les NOX a été étendu à de nombreux processus physiologiques essentiels tels que la signalisation cellulaire, la régulation de la pression sanguine ainsi que l'expression des gènes ou encore la synthèse d'hormones, notamment avec la découverte d'isoformes supplémentaires de NOX [21] qui diffèrent selon la localisation tissulaire ou le mécanisme d'activation.

En raison de l'implication attribuée aux NOX dans ces fonctions cellulaires multiples, la description de cette famille d'enzymes, dont l'étude constitue le sujet de la thèse, sera approfondie dans la partie I.2 de l'introduction.

E. La myéloperoxydase

La myéloperoxydase (MPO) est une peroxydase hémique exprimée en abondance dans les granules primaires des neutrophiles polynucléaires, où elle exerce un rôle important pour l'activité microbicide en catalysant sous la dépendance des NOX la formation de ROS, notamment d'acide hypochloreux en couplant la dismutation (Eq 1.7) de l'H₂O₂ à l'oxydation d'un anion chlorure (Eq. 1.8) pour former l'HOCl [22, 23].



F. Les sources exogènes de ROS

Les ROS peuvent également être engendrés dans différents sites cellulaires suite à l'exposition à de nombreux facteurs externes tels que l'exposition à des radiations ionisantes (γ ou UV), à diverses substances chimiques, des polluants, des métaux lourds, ou encore à des chocs thermiques (Tab.1.1.2). L'ingestion de toxines ou de médicaments, pouvant subir des cycles futiles redox [24], peut conduire à la production de ROS ou de radicaux libres [13]. D'autres mécanismes spontanés inéluctables, tels que l'auto-oxydation de composés incluant les neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine) peuvent également conduire à une production « accidentelle » de ROS.

Sources Endogènes de ROS	Sources Exogènes de ROS
Mitochondries	Fumée de cigarettes
Peroxisomes	Rayonnement U.V.
Phagocytes	Radiations Ionisantes
Cytochrome P450	Pollution
NADPH oxydases	Ozone
Oxyde Nitrique Synthases (NOS)	Agents Chimiothérapeutiques
Xanthine Oxydases	Pesticides
Réticulum Endoplasmique	Solvants Organiques
Hèmes protéiques	Alcool
Réactions avec les Ions Métalliques	

Tab.1.1.2 : Récapitulatif des sources endogènes et exogènes de ROS.

4. Effets physiologiques des ROS

En raison de l'électron célibataire présent sur leur couche électronique externe, tous les oxydants de la famille des ROS démontrent une capacité à réagir avec les biomolécules telles que les protéines, l'ADN ou encore les lipides [25].

A. Réactivité des ROS avec les protéines et les acides aminés

En raison de leur abondance au sein de la cellule, les protéines constituent la cible majeure des ROS et sont impliquées dans 70% des réactions totales intervenant avec ceux-ci au sein de la cellule [26]. Les modifications par les ROS peuvent survenir au niveau des résidus sur les chaînes latérales des acides aminés ou directement impliquer le squelette peptidique.

Les modifications des protéines engendrées par les ROS concernent aussi bien des modifications globales, affectant la majorité des résidus, que des modifications spécifiques qui concernent un acide aminé particulier [27]. Ainsi l'oxydation d'un résidu conduisant à la perte d'un hydrogène et la formation d'un radical alkyle est un exemple de modification globale qui aboutit généralement au clivage du squelette peptidique [28]. Concernant les modifications spécifiques, les résidus soufrés, cystéines et méthionines, ainsi que les résidus aromatiques, constituent les espèces les plus sensibles. Le groupement thiol (R-SH) présent dans les chaînes latérales des résidus cystéines et méthionines sous forme anionique à pH neutre, en raison d'un pKa affaibli par les interactions électroniques des résidus voisins, confère à ces acides aminés un fort potentiel réducteur [29].

a. Les résidus cystéines

Les résidus cystéines sont les cibles privilégiées des ROS et bien que leur présence soit relativement rare au sein du protéome humain (2,26%) [9], ces derniers sont souvent localisés au niveau du site actif des protéines et impliqués dans la modulation de l'activité enzymatique. L'oxydation du groupement thiol conduit à la création de l'acide sulfénique (R-SOH), instable et pouvant réagir rapidement avec un second groupement thiol de la même molécule ou d'une molécule avoisinante pour former un pont disulfure respectivement intra ou intermoléculaire (Fig.1.1.7) [30]. L'acide sulfénique peut également réagir avec une molécule d'origine endogène telle que le glutathion (R-S-S-GSH) ou subir une suroxydation, généralement non réversible, en acide sulfinique (R-SO₂H) puis en acide sulfonique (R-SO₃H). L'oxydation des cystéines du site actif d'une protéine en R-SO₂H ou R-SO₃H entraîne l'inhibition irréversible de la fonction enzymatique, et pourrait être un marqueur de dégradation de la protéine [31]. En effet, la conversion des résidus cystéines localisés à l'extrémité N-ter des protéines activatrices des protéines G en acide sulfonique conduit à l'arginylation et l'élimination de ces enzymes [32].

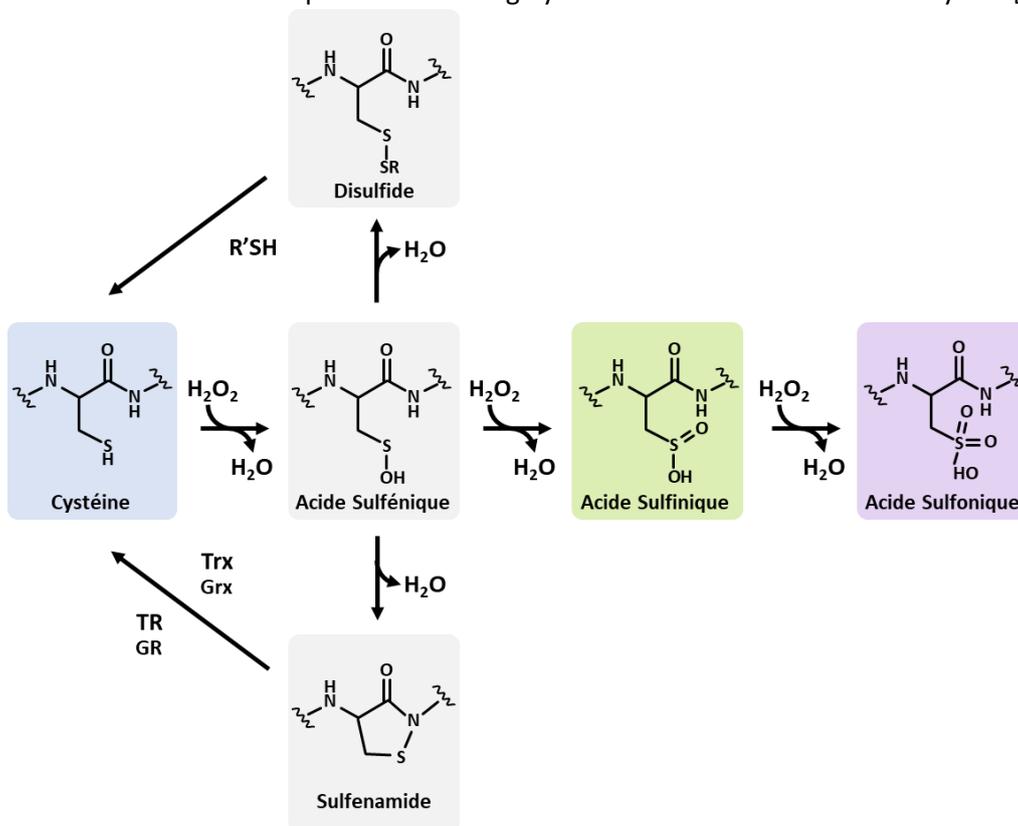


Fig.1.1.7 : Modifications possibles des cystéines par les ROS. Reproduit d'après [30]

b. Les résidus méthionines

Les résidus méthionines sont également très sensibles aux modifications par les ROS et plus particulièrement par l'H₂O₂. Ces résidus peuvent subir des réactions d'oxydation, plus lentes que dans le cas des cystéines menant potentiellement à la formation du radical cationique de la méthionine ou de la méthionine sulfoxyde, mais également des réactions irréversibles de suroxydation conduisant à la formation des groupements méthionine sulfone et méthionine sulfoximine (Fig.1.1.8).

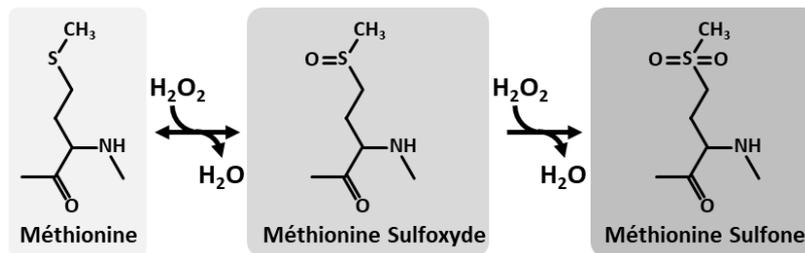


Fig.1.1.8 : Modifications des méthionines par les ROS

c. Les résidus aromatiques

Les acides aminés aromatiques constituent la troisième cible d'oxydation spécifique des protéines. La figure 1.1.9 résume les modifications susceptibles d'intervenir sur les quatre résidus aromatiques en conditions oxydantes.

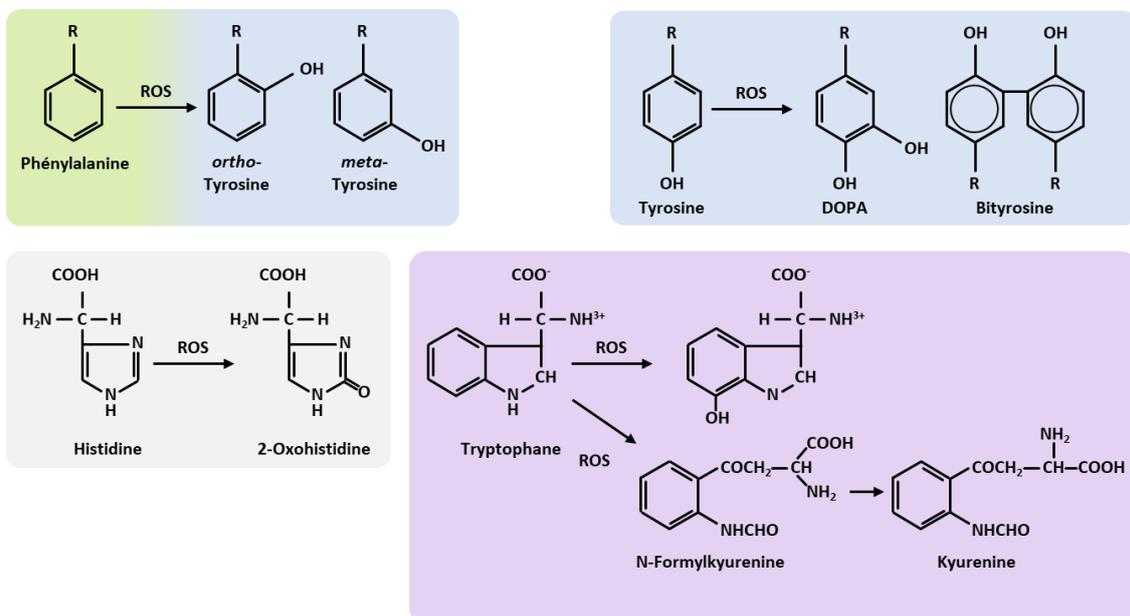


Fig.1.1.9 : Principales modifications des résidus aromatiques par les espèces réactives de l'oxygène. Les modifications par les ROS de différents types d'acides aminés sont regroupées par groupe de couleur, respectivement phénylalanine (vert), tyrosine (bleu), histidine (gris) et tryptophane (violet).

L'action des ROS sur les protéines (Fig.1.1.10) se traduit généralement par la perte de leur structure secondaire et tertiaire (repliement, dépliement de la protéine, inactivation des protéines à centre fer-soufre par décooordination du fer) et par conséquent un changement ou une perte de leur activité, stabilité et solubilité. L'oxydation des protéines peut également mener à leur dégradation ou leur agrégation, les protéines non réparables étant ainsi ciblées par différentes enzymes ou complexes tels que le protéasome ou les calpaines pour procéder à leur élimination. Cependant, certaines protéines modifiées irréversiblement ne sont parfois ni réparables, ni dégradables et s'accumulent alors au niveau des cellules ou des tissus.

B. Peroxydation lipidique

Les lipides, constituants principaux des membranes cellulaires, sont particulièrement sensibles à l'altération par les ROS, en particulier les acides gras polyinsaturés, présentant des doubles liaisons avec une liaison hydrogène-carbone plus faible. La peroxydation lipidique est un phénomène d'oxydation en chaîne qui s'initie par l'abstraction d'un atome d'hydrogène par un radical hydroxyle, conduisant à la formation d'un radical alkyle [33].

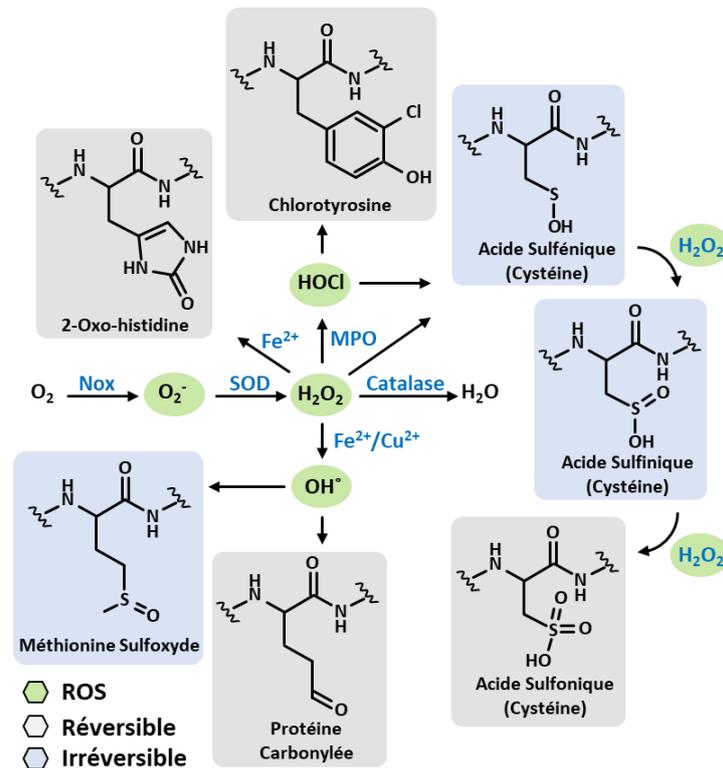


Fig.1.1.10 : Principales modifications des acides aminés au sein des protéines induites par les ROS. L' H_2O_2 , issu notamment de la dismutation du O_2^{\bullet} produit par les NOX est un réactif central à l'origine de la modification réversible (gris) ou irréversible (bleu) de nombreux résidus au sein des protéines. Les ROS sont indiqués en vert.

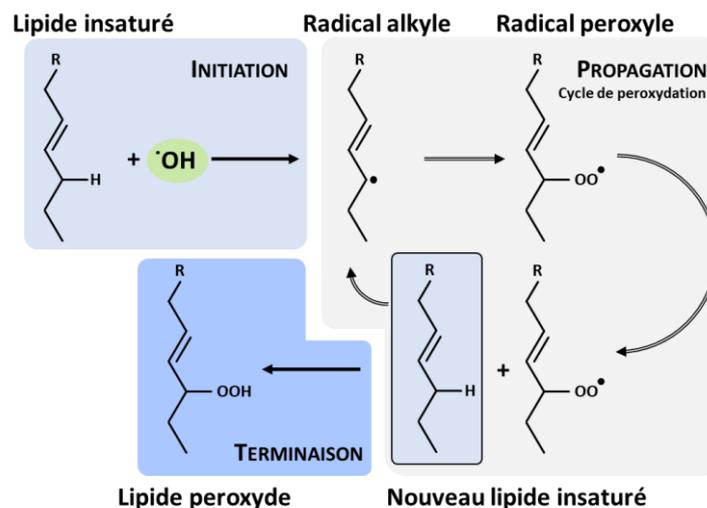


Fig.1.1.11 : Etapes de la peroxydation lipidique initiée par les ROS. Les ROS sont indiqués en vert. Au cours de la peroxydation lipidique, un premier lipide est oxydé par les ROS pour former un radical alkyle (initiation) rapidement converti en radical peroxyde capable d'oxyder un nouveau lipide. L'étape de propagation se poursuit jusqu'à la recombinaison des radicaux lipidiques entre eux pour former des produits non radicalaires (terminaison).

Le radical alkyle ainsi produit dans l'étape d'initiation réagit très rapidement avec 3O_2 pour former un radical peroxyde capable de soustraire un atome d'hydrogène à une nouvelle molécule d'acide gras voisine pour former un hydroperoxyde qui va à son tour parcourir le cycle de peroxydation lipidique (radical alkyle \rightarrow radical peroxyde \rightarrow soustraction d'un atome d'hydrogène) (Fig.1.1.11). L'étape de propagation, consistant en une succession de cycles d'oxydation, se poursuit jusqu'à ce que les radicaux lipidiques se recombinent entre eux pour former des produits non radicalaires. Ce processus augmente l'hydrophilie des acides gras ce qui tend à altérer la structure des membranes cellulaires et

à dégrader leur perméabilité et *in fine* leur intégrité ainsi que leur fonction de membranes, notamment leur rôle de barrière, de transport ou de récepteur.

C. Dégradation par oxydation de l'ADN

Les radicaux hydroxyles HO^\bullet sont également susceptibles d'oxyder l'ADN au niveau du squelette désoxyribose de la chaîne principale, pouvant conduire à des cassures simple et double brin [34], ainsi qu'au niveau des bases azotées, affectant alors les interactions protéine-ADN. Parmi les modifications des bases de l'ADN médiées par les ROS (incluant notamment l'oxydation, la nitration, l'halogénéation et l'alkylation), l'oxydation de la guanine, qui présente le plus faible potentiel d'oxydoréduction, en 8-oxoguanine (Fig.1.1.12) constitue un des dommages les plus fréquents et l'un des plus dangereux. En effet la 8-oxoguanine peut s'apparier à l'adénine et échapper au système de reconnaissance de mésappariements des ADN polymérases, conduisant ainsi à des erreurs irréversibles de réplication de l'ADN [35].

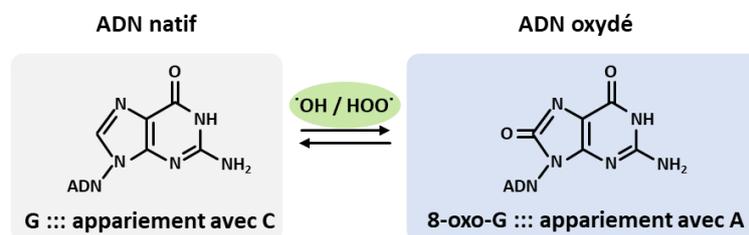


Fig.1.1.12 : Modification de la guanine en 8-oxoguanine par les ROS à l'origine de mésappariements des bases de l'ADN. Les ROS sont indiqués en vert. L'oxoguanine peut s'apparier avec l'adénine et échapper au système de reconnaissance des polymérases, entraînant des erreurs de réplication, entraînant certaines mutations conduisant à la carcinogenèse.

Au sein de la cellule, les mitochondries représentent des organites particuliers, qui, au cours de l'évolution, ont conservé leur propre génome. Bien que très réduit par rapport à celui d'une bactérie, l'intégrité de celui-ci est essentielle au bon fonctionnement de ces organites. Or, en raison de sa proximité avec la chaîne respiratoire représentant la source principale de production de ROS au sein des mitochondries, l'ADN mitochondrial présente un risque plus élevé de dommages induits par les ROS. En effet, le taux de bases azotées oxydées au sein de celui-ci serait ainsi 10 à 20 fois plus élevé que celui de l'ADN nucléaire. L'ADN mitochondrial représente ainsi la cible de la majorité des réactions des ROS intervenant avec les acides nucléiques [36].

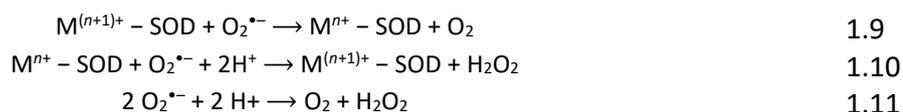
5. Prise en charge des ROS

Les ROS étant capables d'oxyder l'ensemble des composants cellulaires et d'impacter leurs fonctions, les cellules ont développé des processus de défense permettant de réguler la présence de ces espèces pour éviter qu'elles ne s'accumulent dans les cellules. Ces mécanismes sont regroupés sous le terme d'antioxydants et définis par l'ensemble des systèmes de contrôle, enzymatiques ou non, et agissant à faible concentration par rapport au substrat, pour ralentir ou empêcher l'oxydation de celui-ci [37].

A. Systèmes enzymatiques

a. Les superoxydes dismutases

La famille des superoxyde dismutases (SOD) de type 1 et 2, découvertes en 1969 [38] catalyse l'élimination de l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, formant ainsi par réactions successives du peroxyde d'hydrogène et de l'eau. Le mécanisme enzymatique de celles-ci varie selon la nature du cofacteur métallique qu'elles chélatent (Eq.1.4, 5 & 6) dont la nature est variable. Chez les mammifères, trois types de SOD ont été caractérisées, la SOD Cu-Zn, la SOD-Fe et la SOD-Mn (mitochondriale) [39].



La SOD est également en charge de la décomposition de l' HO_2CO_2 avec une efficacité fortement réduite par rapport à l'ion superoxyde (Tab.1.1.3).

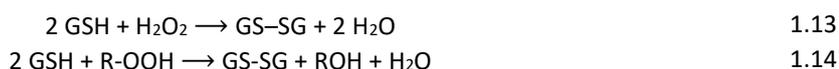
b. Les catalases

Les catalases, présentes dans les peroxysomes, incorporent généralement un groupement hémunique permettant la catalyse de la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène (Eq.1.1.12).



c. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des sélénoenzymes présentes dans le liquide extracellulaire et dans les cellules, au niveau du cytosol et des mitochondries, capables de catalyser l'oxydation du H_2O_2 ou d'autres hydroperoxydes organiques en utilisant spécifiquement le glutathion (GSH) comme réducteur. La présence d'une sélénocystéine au sein du cœur catalytique de celles-ci garantit une réaction rapide avec le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux peroxydes ainsi qu'une réduction rapide par le GSH [40] (Eq.1.13 et 1.14) transformant ainsi une molécule toxique en molécules assimilables (eau ou alcool) afin d'éviter l'oxydation des thiols protéiques.



d. Les peroxyredoxines

Les peroxyredoxines sont des peroxydases, enzymes à base de cystéines, ne nécessitant aucun cofacteur pour leur activité et chargées de réguler le taux de peroxydes au sein des cellules. Lors de leur cycle catalytique, les groupements thiols des cystéines localisées dans un motif très conservé (PXXX[T/S]XXC), attaquent le substrat hydroperoxyde et s'oxydent en acide sulfénique, ensuite généralement converti en ponts disulfures intra ou intermoléculaires (Eq.1.15) avant d'être réduits pour revenir à l'état initial de thiols [41].



B. Systèmes non enzymatiques

a. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide antioxydant composé d'un acide glutamique, d'une cystéine et d'une glycine. Représentant majoritaire dans la cellule du groupement thiol non protéique, il constitue avec sa forme disulfure GSSG, un système de régulation du potentiel redox au sein de la cellule [42]. Le GSH joue un rôle essentiel dans la prise en charge des ions métalliques lourds par l'intermédiaire de son groupement thiol, qui chélate ces métaux grâce à une liaison soufre métal permettant d'excréter les toxines et inhiber la réaction de Fenton. Le GSH participe également à la détoxification des ROS de type peroxydes grâce à sa fonction de cofacteur des GPx et peroxyredoxines.

b. Les Autres Antioxydants

D'autres petites molécules telles que la vitamine C (acide ascorbique) réagissent avec les espèces réactives pour assurer un rôle antioxydant. La vitamine E quant à elle, protège les lipides de l'oxydation et participe également à l'élimination des ROS.

ROS scavengers	Type Cellulaire	Gamme de concentration	Taux de réaction
GSH	Ubiquitaire	1-10mM	H ₂ O ₂ (10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)
SOD	Cellules du foie, neurones, érythrocytes	24μM Cu-Zn SOD	O ₂ • ⁻ (10 ⁹ M ⁻¹ s ⁻¹)
		11μM Mn-SOD (Mitochondrie)	HO ₂ CO ₂ (1600 M ⁻¹ s ⁻¹)
Peroxyrédoxines	Cellules cancéreuse, Neurones	65μM Per.1 et 2 (Cytosol)	ONOO ⁻ (10 ⁶ -10 ⁸ M ⁻¹ s ⁻¹)
		125μM Per.3 (Mitochondrie)	H ₂ O ₂ (10 ⁵ -10 ⁸ M ⁻¹ s ⁻¹)
Catalase	Cellules du foie	~105 U/mg de protéine	H ₂ O ₂ (10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹)
Glutathion Peroxydase	Ubiquitaire	15-30 U/mg de protéine	H ₂ O ₂ (10 ⁷ -10 ⁸ M ⁻¹ s ⁻¹)
		~2μM dans les cellules	

Tab.1.1.3 : Systèmes antioxydants permettant de lutter contre les ROS. Adapté de [9].

6. Les Rôles des ROS

Dans un contexte où le lien implicite entre stress oxydatif et pathologies est établi depuis des années, décrivant ainsi initialement les ROS uniquement comme produits secondaires délétères intrinsèques au métabolisme aérobie responsables de dommages aux macromolécules biologiques, la découverte d'enzymes dédiées à la production de ROS et la diversité des sources à l'origine de ceux-ci, a permis la reconsidération de la vision manichéenne selon laquelle les ROS et le stress oxydant qu'ils peuvent engendrer sont uniquement toxiques pour la cellule (Fig.1.1.13) [43, 44], déplaçant ainsi cette conception d'une notion de simple présence nocive à une notion d'homéostasie [45, 46].

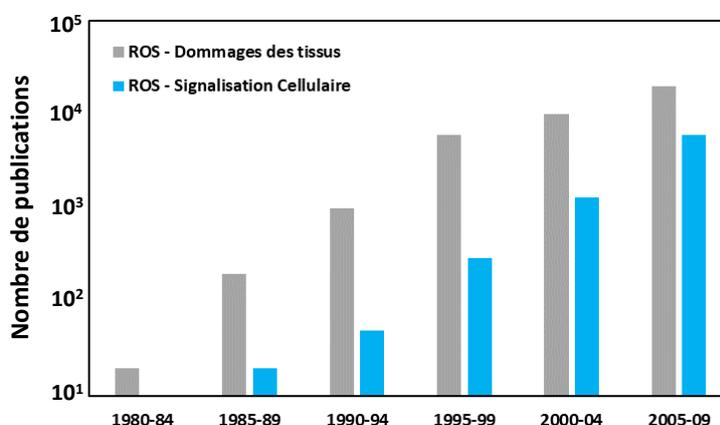


Fig.1.1.13 : Evolution du nombre de publications impliquant les ROS entre 1980 et 2010. Alors que le rôle des ROS était principalement associé à des dommages oxydatifs au sein des tissus (gris) autour de 1980, un nombre croissant d'études a souligné la fonction physiologique des ROS principalement en tant que messagers secondaires dans les processus de signalisation cellulaire (bleu). Reproduit d'après [45].

En effet, les ROS peuvent également s'avérer bénéfiques dans certains cas, par exemple lorsque leur production est restreinte au phagolysosome, où ils sont responsables de l'activité antimicrobienne [47] et ceux-ci peuvent intervenir dans des processus physiologiques capitaux, tels que la signalisation où ils agissent comme médiateurs essentiels au bon fonctionnement cellulaire [48]. Ainsi, la production restreinte de ROS à la localisation subcellulaire appropriée, en quantité, temps, et durée adéquate permet aux ROS de contribuer à la physiologie cellulaire normale [49]. L'intervention d'un système de

défense antioxydant permet également la modulation du taux de production de ROS. L'action complémentaire de ces deux systèmes contribue au maintien de l'homéostasie redox.

Sous des conditions physiologiques, les cellules maintiennent une homéostasie normale à un faible niveau basal de ROS en contrôlant l'équilibre entre la génération de ROS et leur élimination [46].

Cependant, lorsque que la production de ROS échappe à ces restrictions, soit en raison d'une production excessive de ROS (vieillesse, athérosclérose) soit d'une défaillance du système antioxydant (exposition au tabac, obésité), cela entraîne un déséquilibre dans l'état redox normal et les macromolécules subissent alors des dommages. Cette situation définit l'état de stress oxydant [50].

Ainsi ce système de balance redox engendre au niveau cellulaire des conséquences proportionnelles au déséquilibre subi en référence à la situation d'homéostasie. L'impact du stress oxydant au niveau cellulaire peut ainsi être variable, mais les dommages créés par les ROS sont souvent réversibles grâce à la réparation, remplacement, dégradation ou séquestration des molécules endommagées. Ainsi, alors que des niveaux faibles de production de ROS peuvent perturber les fonctions cellulaires par des mécanismes subtils, souvent transitoires, l'exposition à des niveaux élevés de ROS ne pouvant être détoxifiés par les systèmes antioxydants entraînent un déséquilibre de l'état cellulaire redox. La production de dommages excédant la capacité de la cellule à compenser ceux-ci (perte des centres [Fe-S], formation de groupes carbonyles sur les chaînes latérales des protéines, modification des bases nucléotidiques de l'ADN irréparable par excision) peuvent aboutir à des conséquences irréversibles compromettant l'intégrité cellulaire et pouvant ainsi favoriser la carcinogénèse [51], neurodégénérescence [52, 53] ou le diabète [54]. En réalité, les pathologies surviennent principalement sous des conditions extrêmes de stress oxydatif liées à un déséquilibre massif de la balance redox.

Ainsi le maintien de l'homéostasie est crucial pour la croissance cellulaire normale et la survie, où les ROS peuvent être considérés comme à double tranchant [11]. Alors qu'une surproduction modérée de ROS peut promouvoir la prolifération cellulaire et la survie, lorsque la quantité de ROS générés dépasse les capacités des systèmes de défense antioxydante de la cellule, cela peut induire des effets délétères irréversibles allant jusqu'à la mort cellulaire.

Enfin la rupture de l'homéostasie redox peut également survenir suite à l'exposition à des molécules d'origine exogène (agents environnementaux pro-oxydants, intoxications aux métaux lourds, irradiations), des anomalies génétiques, ou des carences en antioxydants.

A. Théorie des Radicaux libres

Suite à la découverte des radicaux libres en 1954 [55], une première théorie proposée par Harman [56] suppose une accumulation au sein des cellules de radicaux provenant des processus oxydatifs normaux du métabolisme cellulaire et participant au développement du vieillissement. La quantité croissante de ROS dans les cellules au cours du temps participerait alors à la perte progressive des fonctions cellulaires par oxydation des biomolécules.

B. Rôle des ROS dans la défense immunitaire

Face aux menaces des pathogènes, les organismes vivants ont développé une variété de mécanismes de défense permettant la prise en charge des agents infectieux et leur élimination. Le premier rôle fonctionnel ainsi attribué aux ROS fut leur implication dans la réponse du système immunitaire. Suite à l'exposition aux pathogènes, une large consommation d'oxygène d'origine non mitochondriale est constatée dans les leucocytes [57] lors de la phagocytose. En 1961, des études mettent en évidence

que la respiration des neutrophiles conduit à la production de peroxyde d'hydrogène [20], nécessaire à l'élimination des micro-organismes phagocytés [58]. Cette observation est confirmée quelques années plus tard par la découverte de la NADPH oxydase phagocytaire, une enzyme localisée dans la membrane des leucocytes où elle effectue, lors de la phagocytose, une production intense appelée « Burst oxydatif » d'anions superoxydes assurant, après conversion en peroxyde d'hydrogène une espèce réactive à fort potentiel bactéricide, une dégradation rapide des pathogènes à éliminer (Fig.1.1.14). Par l'intermédiaire d'une réaction catalysée par la myéloperoxydase (MPO), se liant par interaction ionique à la surface de la bactérie, le peroxyde d'hydrogène est converti en acide hypochloreux [59]. Ce dernier est capable de réagir localement avec l' $O_2^{\bullet -}$ pour produire le radical hydroxyle au contact direct de la bactérie et ainsi largement améliorer l'efficacité de l'attaque oxydante initiée par les neutrophiles [60].

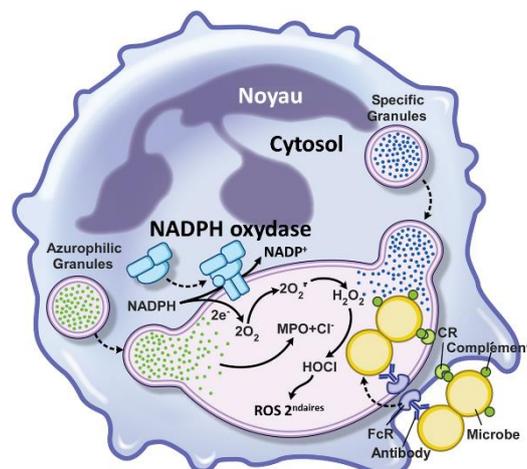


Fig.1.1.14 : Schéma descriptif d'un neutrophile avec la NADPH oxydase phagocytaire dans la membrane du phagosome. Suite à la détection d'un pathogène, la NOX est responsable de la production, au sein du phagosome, d'anions superoxydes convertis en H_2O_2 puis en HOCl, tous deux possédant un fort potentiel bactéricide. La production de ROS s'accompagne du déversement de molécules bactéricides et protéines lytiques contenues dans les granules

C. Rôle des ROS comme molécule signal

Au sein de la cellule, qui représente un environnement compartimenté, le transfert d'informations entre protéines, voies de signalisation, organites, cellules et le milieu extérieur est assuré par des signaux chimiques. La signalisation cellulaire constitue un système complexe de communication permettant d'ajuster, en fonction des stimuli, les processus physiologiques fondamentaux pour le fonctionnement cellulaire normal. En évoluant, les voies de signalisation se sont diversifiées, exploitant différents modes de communication tels que les mécanismes synaptiques, endocriniens ou paracrines. Les signaux chimiques impliqués dans ces mécanismes sont généralement associés aux enzymes phosphatases et d'ubiquitination, cependant, un nombre croissant d'études mettent désormais en évidence une signalisation alternative introduite sous le terme de signalisation cellulaire redox, dont la fonction est réalisée grâce à la réactivité des ROS [9].

L'efficacité d'un médiateur à porter efficacement un message repose sur des propriétés de concentration, diffusion, réversibilité pour assurer la transmission transitoire d'un signal (ON/OFF) et ainsi respecter une spécificité spatiale et temporelle de la signalisation redox.

La coordination requise entre le senseur et la molécule effectrice constitue ainsi un paramètre critique.

a. Réversibilité des signaux redox

Le premier mécanisme de la signalisation cellulaire redox à avoir été caractérisé est l'oxydation des résidus cystéines des protéines par l' H_2O_2 [46, 48, 61, 62]. À pH physiologique, les cystéines sont généralement sous forme anionique (Cys-S⁻) rendant celles-ci plus sensibles à l'oxydation comparées

à la forme protonée (Cys-SH) [63]. Lors de la signalisation redox, l' H_2O_2 est capable d'oxyder l'anion thiolate en acide sulfénique (Cys-SOH), provoquant des changements allostériques au sein des protéines pouvant altérer la fonction de celles-ci. La forme sulfénique peut ensuite être réduite en anion thiolate par les thioredoxines disulphide reductases (Trx) et les glutaredoxines (Grx) pour que la protéine retrouve son état initial. Ce mécanisme reposant sur le transfert d'électron permet ainsi à la cellule de bénéficier d'une voie de communication réversible, donc peu coûteuse en énergie pour la cellule, et permet également, grâce aux propriétés de réaction des ROS avec des atomes spécifiques présents dans de nombreuses molécules, de garantir une spécificité à l'échelle atomique tout en assurant la transmission simultanée du signal à l'ensemble du protéome via de multiples voies de signalisation. De plus, le pKa des cystéines régissant l'équilibre entre thiol et anion thiolate, celui-ci est très sensible à l'environnement électronique du résidu ciblé et peut ainsi varier selon une gamme de valeurs comprises entre 4 et 10 en fonction des acides aminés présents autour. Cette diversité des pKa conduit à une large gamme de réactivité des cystéines, et par conséquent, à un ajustement précis des réponses face à la signalisation redox [63]. L'oxydation des cystéines en acides sulféniques peut également générer des ponts disulfures par interaction avec des thiolates avoisinants permettant le transfert du signal redox d'une protéine à l'autre. L'oxydation des protéines par les ROS peut également se faire sur d'autres résidus que les cystéines ou entraîner la formation de produits plus stables que l'acide sulfénique (Cyt-SOH), tels que l'acide sulfinique (Cys-SO₂H) ou sulfonique (Cys-SO₃H), et ainsi pourrait permettre de prolonger les signaux redox ou de réguler la réduction de manière plus fine (Fig.1.1.15).

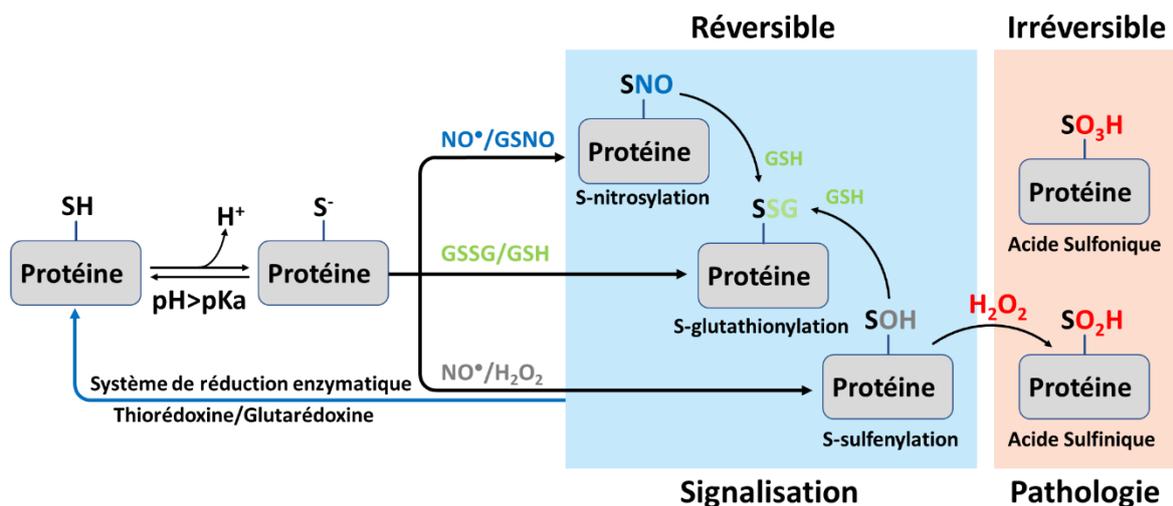


Fig.1.1.15 : Schéma d'oxydation des thiols protéiques pour la signalisation redox. Lors que le pKa local d'un thiol au sein d'une cystéine de la protéine est inférieur au pH, le thiol prend une forme anionique hautement susceptible de subir une oxydation par les ROS. Dans le cas d'une oxydation simple, la modification est réversible et compatible avec une signalisation transitoire. Certaines modifications, conduisant à la formation d'espèces secondaires plus stables, sont irréversibles, et peuvent générer des dégâts au sein des protéines ou conduire à des signaux prolongés.

b. Système de régulation spatiale et temporelle

Parallèlement à la spécificité des modifications, la réversibilité des processus de signalisation, la localisation de production des ROS au sein des cellules, ainsi que la stabilité et les propriétés de diffusion de l'espèce produite sont des paramètres critiques pour l'efficacité de la signalisation redox. En effet dans le contexte cellulaire très peuplé, les macromolécules se trouvent généralement en état stationnaire au sein d'un environnement potentialisant la diffusion ininterrompue de petites molécules selon un flux très dense et très actif.

Ainsi, bien qu'il existe certains phénomènes relayant les stimuli grâce à l'utilisation d'une cascade de multiples effecteurs propageant alors la signalisation au-delà des capacités de diffusion de

l'intermédiaire réactif impliqué initialement, l'oxydation des protéines cibles et donc la transmission efficace du message est largement favorisée lorsque les intermédiaires réactifs effecteurs sont formés au contact direct de la cible primaire [9]. En effet, la génération d'un burst confiné de la molécule réactive à proximité du senseur privilégié permet ainsi d'atteindre une concentration locale élevée de protéines à l'état modifié à un endroit spécifique de la cellule.

En effet, certaines espèces réactives telles que l'anion superoxyde, qui possèdent une faible longueur de diffusion ainsi qu'une incapacité à franchir les membranes, ne peuvent réagir que dans un périmètre restreint autour de leur site de production. La diversité des sources cellulaires de ROS permet la production de radicaux dans tous les compartiments de la cellule, qui, couplée à la régulation temporelle de ces sources, assure au mécanisme redox une régulation spatiale indispensable à toute voie de signalisation.

Cependant, l'existence de processus de détoxification participant à la dilution du signal implique la nécessité d'une présence synchrone du senseur et du médiateur. En effet si la protéine effectrice est absente lors de l'arrivée du signal, ce dernier peut être perdu ou oxyder la mauvaise cible, générant ainsi de potentiels dommages et empêchant le transfert fiable et rapide de l'information. Il est donc primordial que la protéine senseur soit enrichie dans une zone particulière de la cellule ou exprimée de manière ubiquitaire pour permettre la transmission efficace du signal.

Ainsi, la production de ROS en assez faibles quantités pour maintenir des signaux confinés à des localisations subcellulaires restreintes discrètes dans la cellule permet la réalisation d'une action de rhéostat pour une voie de signalisation intervenant à courte portée autour de cette localisation, alors que la production de ROS en quantité assez importantes pour permettre leur diffusion plus étendue dans la cellule permet à ceux-ci d'exercer une fonction de coordination d'une signalisation globale dans la cellule [49].

7. Conclusion

La pléiotropie des ROS ainsi que leur réactivité avec un grand nombre de biomolécules au sein de divers mécanismes de régulation confère à ceux-ci une importance majeure. En tant qu'enzyme spécialisée dans la production d'espèces réactives de l'oxygène, les NADPH oxydase constitue par extension un système crucial impliqué dans de nombreux processus physiologiques.

La famille des Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NAD(P)H) Oxydases (NOX), considérées comme sources majeures de ROS dans les cellules eucaryotes, est constituée de sept membres intervenant dans diverses fonctions physiologiques essentielles. Bien que toutes les isoformes de NOX présentent une homologie structurale avec un cœur catalytique commun composé de six hélices transmembranaires chélatant deux hèmes, ainsi qu'un domaine déshydrogénase carboxy-terminal (C-ter) cytosolique présentant un motif de liaison au NADPH ainsi qu'au cofacteur flavine (FAD) non covalamment lié, elles diffèrent notamment selon le type de mécanisme d'activation ou de régulation employé, ainsi que leur localisation cellulaire et tissulaire. La diversité associée à la famille des NOX permet ainsi la participation de ces protéines à de nombreuses fonctions cellulaires et constituent ainsi le sujet de nombreuses études dès le début du XX^{ème} siècle (Fig.1.2.1).

1. Découverte et historique des NADPH oxydases

L'existence d'un phénomène de respiration cellulaire a été initialement constatée en 1908 lors des travaux de Warburg sur la fertilisation d'oursin, au cours de laquelle intervient une consommation massive d'oxygène lors de la fusion de l'œuf et du spermatoocyte [64]¹.

Bien que le lien avec les NADPH oxydases ne fût pas directement établi, ces observations précoces ont été complétées par l'observation en 1933 [57], puis la caractérisation, 25 ans plus tard, d'un événement similaire réalisé par les cellules neutrophiles pendant la phagocytose (1959), où la surconsommation d'oxygène est alors attribuée aux mitochondries dont l'activité est supposée permettre l'apport d'énergie nécessaire à l'internalisation des pathogènes dans le phagosome [65].

Cependant, l'insensibilité de ce processus phagocytaire aux inhibiteurs classiques de la respiration mitochondriale tels que le cyanure, l'azide ou l'antimycine A, a finalement conduit à l'invalidation de cette hypothèse, permettant ainsi de confirmer l'existence d'une respiration alternative non conventionnelle dépendante du métabolisme du glucose entraînant la génération d'H₂O₂ au sein des phagosomes des neutrophiles (1961) [20].

Alors que la détermination du substrat à l'origine de cette réaction enzymatique a longtemps représenté une source de controverses entre le NADH ou le NADPH, ce n'est finalement que quelques années plus tard que l'implication d'une NADPH Oxydase [66], présentant une sélectivité d'un facteur 100 en faveur du NADPH par rapport au NADH [67, 68], a été démontrée et la contribution d'une myéloperoxydase, nécessaire à la production de ROS responsables de la destruction des pathogènes, établie [69]. Ce phénomène a alors été requalifié de burst oxydatif.

Le produit initial formé au cours de la réaction de respiration a ensuite été attribué à l'anion superoxyde [67]. Il constitue, à travers l'interconversion successive de celui-ci en H₂O₂ catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), le précurseur de ROS secondaires bactéricides tel que l'HOCl généré par la myéloperoxydase (MPO).

¹ Ce phénomène a ultérieurement été attribué à l'activité de l'homologue de DUOX Udx1 [Creton R & Wessel GM (2004) The oxidative burst at fertilization is dependent upon activation of the dual oxidase Udx1. Dev Cell 7, 801–814.]

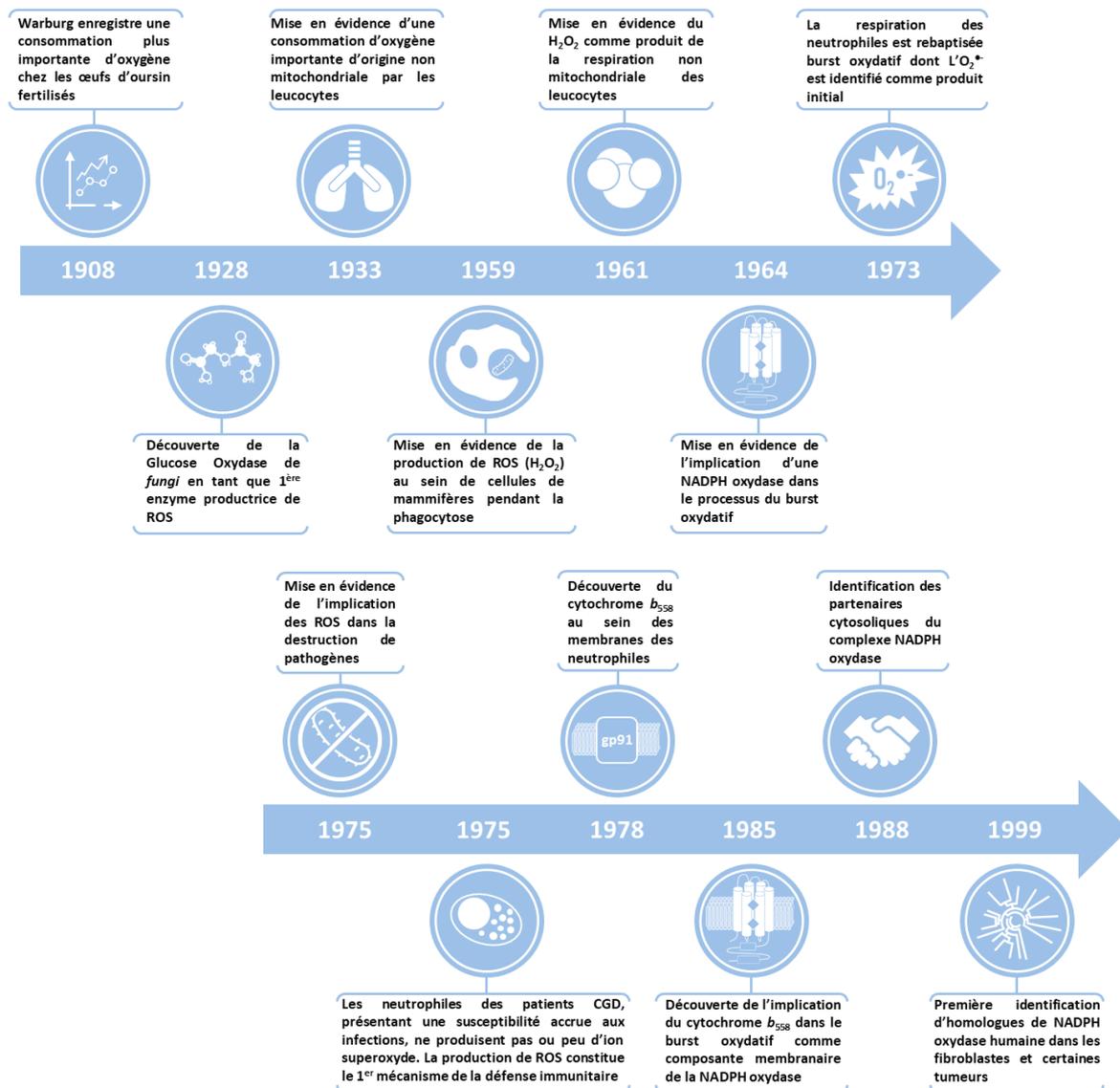


Fig.1.2.1 : Chronologie indiquant les étapes importantes conduisant à l'identification des NADPH oxydases, constituant une famille d'enzymes spécialisées dans la production de ROS impliqués dans la phagocytose.

En parallèle des études moléculaires, les recherches cliniques au sujet de la granulomatose sceptique chronique (CGD) [70], une pathologie liée à un déficit immunitaire rare, ont également largement contribué à la découverte et aux avancées réalisées concernant la compréhension des NADPH oxydases [71].

Ce syndrome se manifeste généralement chez de jeunes garçons qui souffrent alors d'infections récurrentes entraînant l'apparition de foyers inflammatoires granulomateux résultant de l'accumulation excessive de cellules immunitaires incapables d'éliminer les pathogènes phagocytés [72]. En effet, alors que les leucocytes des patients atteints par ce désordre génétique présentent un phénotype normal concernant la chimiotaxie, la phagocytose ainsi que la dégranulation, la fonction de production de ROS est fortement altérée empêchant ainsi ces cellules d'effectuer le burst oxydatif, menant alors à une activité bactéricide réduite [73, 74, 71].

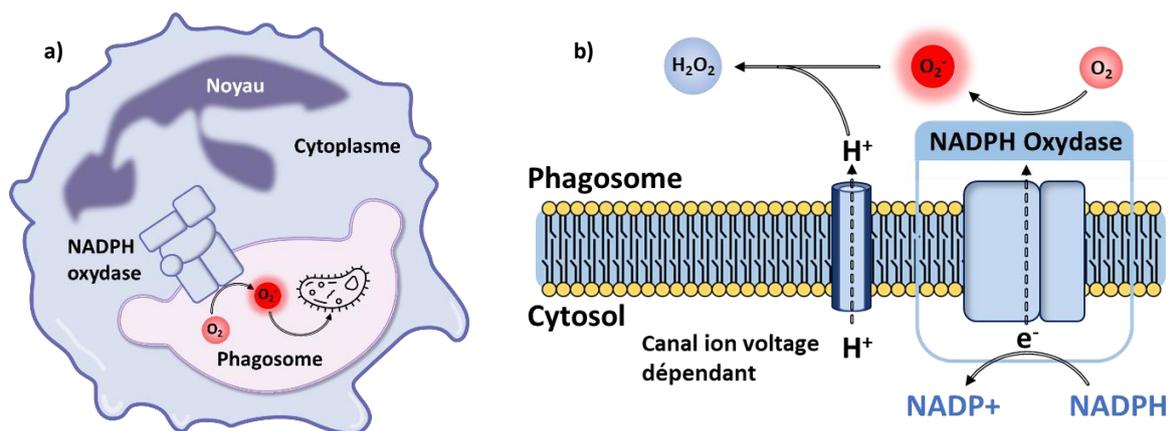


Fig.1.2.2 : Schéma descriptif de la NADPH oxydase phagocytaire impliqué dans la défense immunitaire lors du burst oxydatif. Le complexe NADPH oxydase est localisé dans la membrane du phagosome où il catalyse, lors du burst oxydatif, le transfert d'électrons à travers la membrane, du NADPH cytosolique à l'oxygène moléculaire, pour produire l'anion superoxyde rapidement converti en H_2O_2 conduisant à l'élimination des pathogènes

L'identification et la purification de l'oxydase responsable de la production de ROS dans les cellules phagocytaires a cependant représenté de plus grandes difficultés.

En effet, en raison du manque de spécificité des différents substrats testés, l'évaluation de l'activité oxydase et diaphorase est complexifiée par la présence dans le mélange réactionnel, réalisé à partir de lysat cellulaire, de diverses molécules telles que des espèces réductrices, des ions métalliques, ou encore des lipides. Ainsi, les enzymes initialement incriminées se sont finalement avérées erronées [75]. De plus, malgré la production d'une oxydase active solubilisée à partir de cellules stimulées, la purification de la protéine entière et fonctionnelle est restée impossible en raison de l'instabilité de la protéine, plus particulièrement en raison de sa sensibilité aux conditions ioniques intrinsèques à sa séparation par chromatographie. D'autres part, bien que longtemps restée inaperçue au sein de la communauté scientifique, l'observation dans les granules des neutrophiles de lapin de la présence d'un flavocytochrome de type *b* non conventionnel, initialement attribué à une forme inactive du cytochrome P450, a été réalisée dans les années 1960 [76]. Malgré l'insensibilité de celui-ci aux inhibiteurs conventionnels de la mitochondrie et de la myéloperoxydase, laissant alors supposer sa participation à la respiration des neutrophiles, ainsi que l'absence de ce flavocytochrome dans les leucocytes de nombreux patients GGD, une forte réticence envers l'hypothèse selon laquelle celui-ci pourrait constituer une partie de l'oxydase a longtemps persisté.

Il faut attendre les travaux de Segal et Jones (1978) [77] pour redécouvrir, 17 ans plus tard, la présence dans les membranes des neutrophiles d'un flavocytochrome *b*. Celui-ci a notamment été caractérisé déficitaire chez les patients CGD, permettant ainsi d'expliquer les fonctions altérées que présentent leurs leucocytes (Fig.1.2.2). Initialement désigné flavocytochrome b_{245} d'après son potentiel redox celui-ci a ensuite été renommé b_{558} en raison de la bande d'absorbance caractéristique à 558 nm que présente son spectre différentiel et distinguant celui-ci des cytochromes du réticulum endoplasmique (RE) et de la mitochondrie [78]. Le caractère hétérodimérique du flavocytochrome de la NADPH oxydase phagocytaire (phox) (Fig1.2.3) a finalement été démontré avec la caractérisation d'une protéine de 22kDa ($p22^{phox}$) copurifiée avec le flavocytochrome b_{558} ($gp91^{phox}$), au sein duquel sont liés deux hèmes et une molécule de FAD (Tab.1.2.1) [79, 80].

Le gène codant pour le flavocytochrome de la NADPH oxydase phagocytaire, $gp91^{phox}$, a été identifié et conduit, en raison de l'important niveau de glycosylation associé à la protéine, à l'apparition d'une bande retardée autour de 91kDa lors des caractérisations par western blot [81], bien que le poids moléculaire du flavocytochrome soit en réalité de 58kDa, conduisant finalement à sa désignation comme NOX2 dans la nouvelle terminologie.

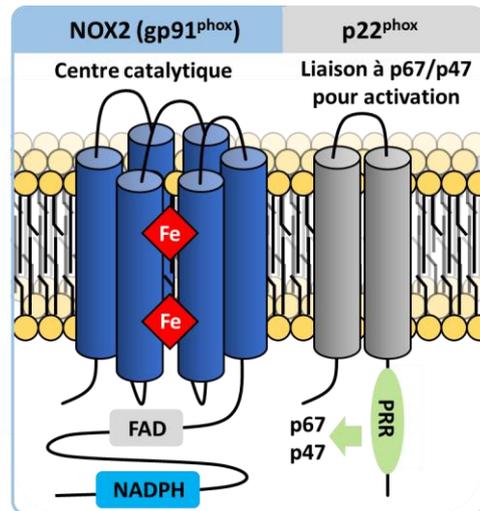


Fig.1.2.3 : Sous-unité catalytique du complexe de la NADPH oxydase phagocytaire. NOX2 se compose de 6 hélices transmembranaires reliées par des boucles intra et extra cellulaires et d'un domaine cytosolique présentant les domaines de liaison au FAD et au NADPH. Les hélices 3 et 5 de NOX2 chélatent deux groupements héminiques de type b. La littérature, selon les travaux considérés, propose un nombre de segments transmembranaires de p22^{phox} variant entre 2 et 4. Dans ce manuscrit, p22^{phox} est représenté avec 2 hélices et un domaine cytosolique en N-ter présentant un domaine PRR permettant son interaction avec les facteurs cytosoliques p67^{phox} et p47^{phox}.

Enfin, le développement des systèmes acellulaires permettant l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire par des lipides en utilisant des fractions cytosoliques et membranaires purifiées, a apporté les outils nécessaires à la caractérisation des derniers composants protéiques du complexe [82, 83]. La découverte des sous-unités cytosoliques organisatrices p47^{phox} et activatrices p67^{phox} ainsi que la protéine modulatrice p40^{phox} a également permis l'identification des rôles de Rac1 (monocytes et macrophages) et Rac2 (neutrophiles), qui constituent de petites protéines liant le GTP participant à l'activation du complexe [84]. L'ensemble de ces sous-unités constitue la composante cytosolique du complexe, et l'inactivation de l'expression de leur gènes respectifs conduit à un phénotype CGD aggravé lorsque les sous-unités Rac sont dysfonctionnelles.

Alors que le terme NOX se réfère spécifiquement à la composante membranaire de l'enzyme assurant le transport des électrons, celui-ci est parfois utilisé par extension pour désigner l'ensemble du complexe multiprotéique [85]. Ainsi la NADPH oxydase phagocytaire est identifiée par le terme NOX2 (gp91^{phox}) (Tab.1.2.1).

NADPH Oxydase (NOX2)
Consommation d'O ₂
Cyano-résistante
Dépendante du FAD et NADPH
Présence de groupement héminique

Tab.1.2.1 : Caractéristiques des protéines de la famille des NADPH oxydases

Par la suite, le développement de systèmes de détection des ROS plus sensibles a permis d'identifier la présence de niveaux plus faibles de ROS dans des cellules non phagocytaires, conduisant alors à la supposition que la production spécialisée d'espèces réactives ne soit pas exclusive aux neutrophiles, et que d'autres processus physiologiques pourraient être ainsi associés à la génération de ROS dans les autres types cellulaires, bien que les sources exactes soient alors encore incertaines.

L'existence de plusieurs systèmes enzymatiques similaires à la NADPH oxydase phagocytaire (NOX2, gp91^{phox}) a finalement été identifiée dans une grande variété de cellules, telles que les fibroblastes [86], certaines tumeurs [87] ou encore des cellules du tissu vasculaire [88]. L'apparition de l'isoforme

NOX1², avec la découverte simultanée par différentes équipes du premier homologue de NOX2 (gp91^{phox}), respectivement désignée par Mox1 (mitogenic oxidase [21] 1), NOH-1 (NADPH Oxidase Homolog-1) [89] et gp91-2 [90] a ainsi finalement conduit à la validation de cette hypothèse.

Cependant, lors de sa transfection en absence de partenaires additionnels, NOX1 demeurait généralement inactive, initiant alors la recherche d'homologues de p47^{phox} et p67^{phox} associés à NOX1 et ultérieurement caractérisés respectivement comme NOXO1 et NOXA1, en accord avec leur rôle respectif d'organisation et d'activation dans le complexe.

L'avènement de la génomique au cours des années 2000 a ensuite conduit à la découverte de nouvelles séquences homologues du gène *CYBB* codant pour NOX2 (gp91^{phox}). Ainsi l'identification de NOX1 a ensuite été rapidement suivie par le clonage de nouveaux homologues : NOX3 [90], NOX4 [91] et NOX5 [92], ainsi que DUOX1 et DUOX2 (DUal OXidase) [93, 94]. Initialement considérées comme des thyroïde oxydases, les DUOX disposent, par rapport au cœur catalytique commun aux différentes isoformes, de motifs additionnels avec notamment la présence d'un segment transmembranaire et d'un domaine peroxydase supplémentaire en N-ter ainsi que de facteurs de maturation spécifiques associés, DUOXA1 et DUOXA2 [95].

Selon le type cellulaire, en plus des isoformes enchâssées au sein de la membrane plasmique, les diverses isoformes de NOX peuvent également être localisées au sein de multiples compartiments cellulaires, tels que le réticulum endoplasmique, le noyau et la mitochondrie.

Alors que les NADPH oxydases ont, depuis leur découverte, été indéfectiblement considérées comme exclusives au règne eucaryote, cette hypothèse a été depuis invalidée avec l'identification récente d'homologues de NADPH oxydases au sein des procaryotes.

2. Organisation, activation et régulation de la NADPH oxydase phagocytaire

A. NOX2 : prototype des NADPH oxydase

NOX2, exprimée dans les cellules phagocytaires, est le prototype des NADPH oxydases et la première des isoformes identifiée [96]. La caractérisation extensive des propriétés biochimiques de celle-ci a constitué un prérequis fondamental à l'appréhension des aspects fonctionnels associés aux différents membres définissant la famille des NOX. En effet, bien que possédant des localisations cellulaires et des mécanismes d'activation distincts, toutes les isoformes partagent une sous unité catalytique commune très similaire à NOX2, à laquelle peut être ajoutée une extension impliquée dans la régulation et liée à leur fonction cellulaire spécifique.

Pendant de longues années, le seul rôle connu de NOX2 est resté limité à son implication dans la défense immunitaire, où elle catalyse le transfert d'électrons à travers la membrane du substrat intracellulaire, le NADPH, au FAD puis à chacun des hèmes *b* pour atteindre l'accepteur final extracellulaire, l'oxygène moléculaire et synthétiser l'anion superoxyde dans le phagosome [97, 98].

Cette production initiale de ROS s'accompagne de la formation du métabolite secondaire H₂O₂, ensuite converti par la MPO en HOCl, principal responsable de la dégradation des pathogènes par les cellules immunitaires [69].

L'implication des NOX a depuis été étendue au sein de divers processus physiologiques tels que la signalisation, la croissance cellulaire, l'angiogenèse ou encore l'apoptose [46, 11, 49, 9, 19].

² Le numéro 1 de l'isoforme NOX1 fut conservé pour faciliter son identification au terme initial de Mox1. En accord avec cette nouvelle dénomination, gp91^{phox}, bien qu'il constitue l'isoforme historique, fut rebaptisé NOX2.

La NADPH oxydase phagocytaire représente donc un complexe multiprotéique composé d'un flavocytochrome b_{558} transmembranaire, composé de NOX2 et de la sous-unité $p22^{phox}$, des facteurs cytosoliques $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$ ainsi que de petites protéines G liant le GTP (Rac1 ou Rac2) [99, 100]. En absence de pathogènes, chacun des composés demeure dissocié à l'état inactif, en revanche, lors de l'activation, les multiples sous-unités sont transloquées à la membrane pour interagir avec le flavocytochrome b_{558} et ainsi initier l'assemblage (Fig1.2.4), l'activation et le transfert d'électrons nécessaires à la production de ROS [101].

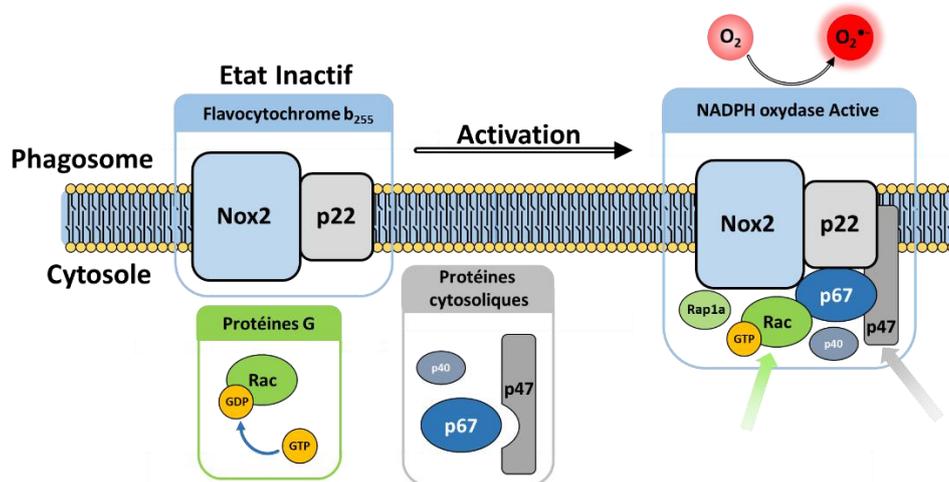


Fig.1.2.4 : Principe d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire lors de l'infection par un pathogène. La détection d'un pathogène déclenche des voies de signalisation conduisant à la migration des facteurs cytosoliques à la membrane où ils interagissent avec la composante membranaire de la NADPH oxydase permettant son activation permettant la catalyse de la production de ROS.

B. Les composants du complexe NADPH oxydase

a. Le flavocytochrome b_{558}

Le flavocytochrome b_{558} constituant la sous unité catalytique de la NADPH oxydase est composé de deux protéines membranaires intégrales codépendantes, NOX2 ($gp91^{phox}$, chaîne lourde) hautement glycosylée et $p22^{phox}$ (chaîne légère), assemblées selon une stœchiométrie 1:1 (Fig1.2.3). L'étude des neutrophiles de patients CGD a révélé que la délétion de l'une de ces deux sous unités conduit à l'absence du partenaire au sein de la membrane [102].

1. NOX2

NOX2 assure le transfert des électrons à travers la membrane, du NADPH cytosolique à l'oxygène moléculaire. L'analyse de la structure primaire de NOX2 révèle la présence à l'extrémité N-ter d'un domaine transmembranaire (TM), de type FRD, composé de 6 hélices α séparées par 5 boucles interhélices respectivement désignées de A à E de l'extrémité aminoterminal à carboxyterminale, où A, C, E sont orientées à la face interne du phagosome, au sein duquel intervient la réduction de l'oxygène et les boucles B et D, connectant respectivement les segments transmembranaires 2-3 et 4-5, sont exposées au cytosol où elles sont en contact d'éléments spécifiques du domaine déshydrogénase (DH) C-ter (Fig.1.2.5) et participent ainsi directement à l'activité de NOX2, bien que le rôle exact de leur implication demeure incertain [103, 104]. Quatre histidines conservées dans la famille des NADPH oxydases, organisées en 2 paires de motifs bishystidyls dont chacun des résidus consensus est séparé par 13 acides aminés et situé sur la troisième (His101 et His115) et la cinquième hélice transmembranaire (His 209 et His 222) de NOX2, chélatent deux groupements hémiques de type B asymétriques hexacoordonnés [105], présentant respectivement un potentiel d'oxydoréduction

de -225mV, associé à l'hème interne (proximal) orienté face cytoplasmique, et de -265mV attribué à l'hème externe (distal), dirigé vers la lumière du phagosome [106].

La région C-ter de l'enzyme, correspondant au domaine déshydrogénase cytosolique de NOX2, homologue à la flavoenzyme ferredoxine-NADP⁺ réductase (FNR) procaryote, comporte les motifs de liaison au donneur d'électrons, le NADPH ainsi qu'au cofacteur FAD. La caractérisation structurale a révélé une architecture présentant 2 motifs protéiques distinctifs, un tonneau β, au sein duquel se loge le FAD, connecté à un repliement de type Rossman, fréquemment rencontré au sein des déshydrogénases à NAD(P)H, au sein duquel se trouve un motif de liaison spécifique des coenzymes nucléotidiques [107].

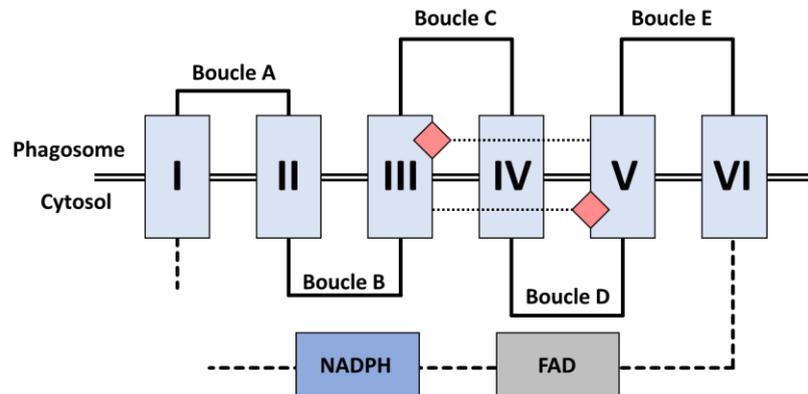


Fig.1.2.5 : Organisation des hélices transmembranaires de NOX2. Les boucles A, C, E sont orientées à la face interne du phagosome, au sein duquel intervient la réduction de l'oxygène et les boucles B et D sont exposées au cytosol au contact des sites de liaison au FAD et NADPH du domaine déshydrogénase de la NOX. Deux hèmes sont coordonnés par des motifs bis-histidines présents sur les hélices III et V.

2. Le transfert d'électron

Le transfert d'électron à travers les membranes catalysé par NOX2, peut être décomposé en sept étapes distinctes par NADPH consommé (Fig.1.2.6.a). Il est initié avec la réduction du cofacteur FAD, lié non covalamment, en FADH₂ par un hydrure provenant du NADPH cytosolique. L'utilisation d'un relais tel qu'une flavine dans les processus biologiques redox permet généralement de découpler l'apport simultané de multiples électrons en un transfert monoélectronique séquentiel requis pour effectuer la poursuite du transfert électronique vers des centres métalliques [108]. L'arrangement linéaire des cofacteurs selon un plan perpendiculaire à la membrane crée un environnement adapté au transfert des électrons de la face cytosolique à l'espace externe [109]. Le transfert d'un électron du FAD réduit (FADH₂, E_m = -304mV) à l'hème interne (E_m = -225mV) (Fig.1.2.6.b), conduisant à la création de la forme semiquinone du FAD (FAD[•]), constitue la seconde étape, préalable au transfert successif de l'électron de l'hème proximal à l'hème distal lors de l'étape 3 et enfin à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire (E_m = -160 mV), aboutissant à la formation d'un anion superoxyde constituant la 4^{ème} étape. Dès l'étape 3 réalisée, l'hème proximal est à nouveau disponible pour la réalisation de la seconde partie de la réaction à travers les étapes 5, 6, 7, correspondant à la reproduction du mécanisme réactionnel constitué par les étapes 2 à 4, à l'exception du donneur d'électron initiant le transfert, remplacé pour l'étape 5 par la forme radicalaire FAD[•] (E_m = -256 mV) de la flavine, dont le potentiel redox réduit par rapport au FADH₂ fournit une force motrice inférieure pour la réduction de l'hème interne. Cependant, en raison des potentiels redox respectifs des hèmes interne et externe, la transmission de l'électron entre les 2 groupements hémiques ne constitue pas un processus énergétiquement favorable et pose question [19, 75, 110, 111]. Alors que l'intérêt fonctionnel lié à une telle architecture au sein de l'enzyme ne soit pas clairement identifié, cela pourrait justifier la

présence indispensable de l'oxygène comme accepteur pour permettre l'établissement d'un flux rapide d'électrons à travers la NADPH oxydase, en absence duquel surviendrait une accumulation d'électrons au niveau de l'hème proximal. En effet, en condition anaérobie, les vitesses de réaction de la flavine, ainsi que du groupement héminique observées sont 1000 fois plus lentes qu'en condition aérobie [112, 113].

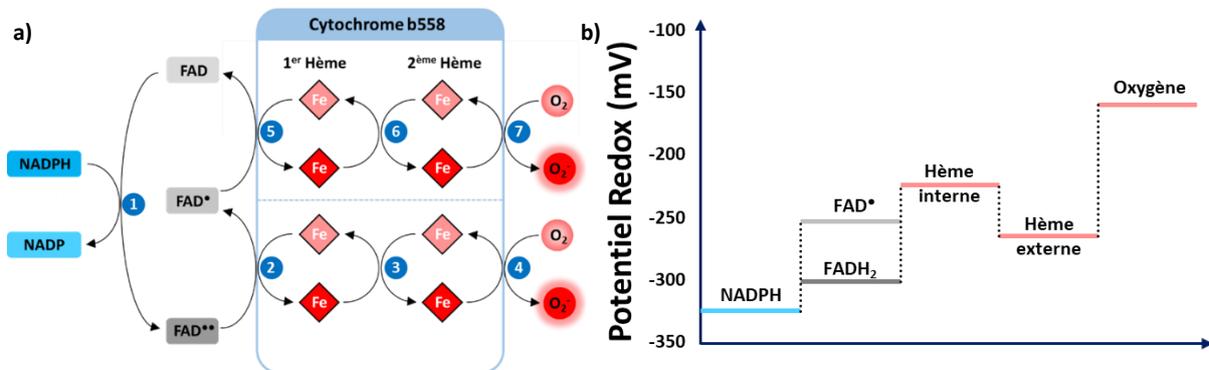


Fig.1.2.6 : Mécanisme du transfert d'électron catalysé par le cytochrome b₅₅₈ de la NADPH oxydase. (a) Le substrat NADPH fournit deux électrons transférés au FAD réduit en FADH₂. Le FADH₂ cède un premier électron à l'hème proximal du cytochrome qui le transfère instantanément à l'hème distal puis à l'oxygène moléculaire, accepteur final qui s'oxyde en anion superoxyde. Le second électron porté par le cofacteur FAD est transféré de la même façon avec comme donneur initial le FAD*. (b) Potentiels redox des différents couples impliqués dans le transfert d'électrons catalysé par les NOX.

L'étude des interactions entre l'oxygène et l'hème externe suggèrent que la réduction de l'O₂ intervient selon un mécanisme de sphère externe (outer sphere) [109, 114] au sein duquel l'oxygène n'est pas directement coordonné physiquement à l'ion ferrique de l'hème distal, mais reçoit par transfert saltatoire indirect un électron provenant de la périphérie de l'hème, en accord avec l'insensibilité de l'oxydase aux inhibiteurs classiques de la respiration tel que le monoxyde de carbone, l'azide ou le cyanide, suggérant l'absence de position libre sur le Fer.

3. Le partenaire membranaire p22

Bien que le transfert d'électrons à travers à la membrane soit exclusivement réalisé au sein de la sous-unité NOX2, celui-ci ne peut être effectué indépendamment de la présence de la sous-unité membranaire p22^{phox}, identifiée en 1987 [115], dont l'interaction mutuellement stabilisante avec NOX2 conditionne la maturation totale du complexe catalytique et intervient comme une plateforme adaptatrice fournissant un site d'ancrage de haute affinité pour les partenaires cytosoliques (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et les petites GTPases Rac³).

En l'absence de données structurales sur la protéine entière, les profils d'hydropathies, déterminés d'après la séquence protéique, ont initialement prédit une topologie où p22^{phox} (195aa) comporterait respectivement un domaine N-ter hydrophobe (174aa) définissant 2 à 4 segments⁴ transmembranaires putatifs [116], positionnant ainsi les extrémité N-ter et C-ter du côté intracellulaire, ainsi qu'un domaine C-ter cytosolique (21a.a) présentant une région PRR (Prolin Rich Region, a.a. 151-160) riche en proline, décrivant un motif consensus PxxP et formant une hélice polyproline II (PPII) [117, 118, 119], indispensable à l'activité NADPH oxydase à travers l'interaction avec la région tandem bis-(SH3) (SRC homology 3) de la sous unité organisatrice p47^{phox}/NOXO1.

³ De manière similaire à Nox2, p22^{phox} peut constituer un hétérodimère avec NOX1,3, et 4 (Bedard and Krause, 2007).

⁴ Malgré diverses études, le nombre de segments transmembranaires de p22^{phox} n'est pas clairement identifié, et la protéine a ainsi été représentée avec 2 hélices α dans le manuscrit.

Plus récemment, la construction d'un modèle structural de $p22^{\text{phox}}$, complétée par les nombreuses données expérimentales acquises à travers l'utilisation d'anticorps spécifiques de la sous-unité membranaire ainsi de l'analyse phénotypique associée à diverses mutations, a suggéré la présence de 3 hélices transmembranaires au sein du domaine C-ter, conduisant à une localisation extracellulaire de l'extrémité N-ter ainsi que de la boucle connectant les hélices 2 et 3, situant ainsi l'extrémité C-ter du côté cytosolique [116].

De plus, la réalisation de délétions spécifiques au sein de $p22^{\text{phox}}$ a permis d'identifier l'implication conjointe des 11 résidus N-ter dans la maturation du cytochrome b_{558} ainsi que dans l'activité NADPH oxydase, soulignant ainsi l'importance fonctionnelle de la partie N-ter très conservée chez les métazoaires [119].

En revanche, la délétion des 54 résidus terminaux du domaine C-ter, dotés, à l'exception de la région PRR, d'une grande variabilité au sein du clade, préserve uniquement la maturation et conduit à une activité catalytique altérée. Cela est en accord avec la fonction de cette région riche en proline, essentielle au recrutement initial de $p47^{\text{phox}}$, et s'accompagnant de la translocation successive des divers partenaires lors de l'activation [119].

D'autre part, la mutation P156G dans cette région des neutrophiles humains, bien que n'ayant aucune influence directe sur l'expression de $p22^{\text{phox}}$, rend impossible la translocation à la membrane de la protéine $p47^{\text{phox}}$ en complexe avec $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ après activation des neutrophiles, et a ainsi permis d'établir plus particulièrement l'implication étroite dans la liaison à $p47^{\text{phox}}$ de trois résidus conservés, avec respectivement P152 et P156 liant le motif SH3 N-ter de $p47^{\text{phox}}$ et P158 interagissant avec le domaine C-ter de celui-ci [119].

D'autres résidus de $p22^{\text{phox}}$ (P151, P155, P157, P160) ont également été identifiés comme intervenant dans l'interaction avec $p47^{\text{phox}}$, en exerçant cependant une moindre influence.

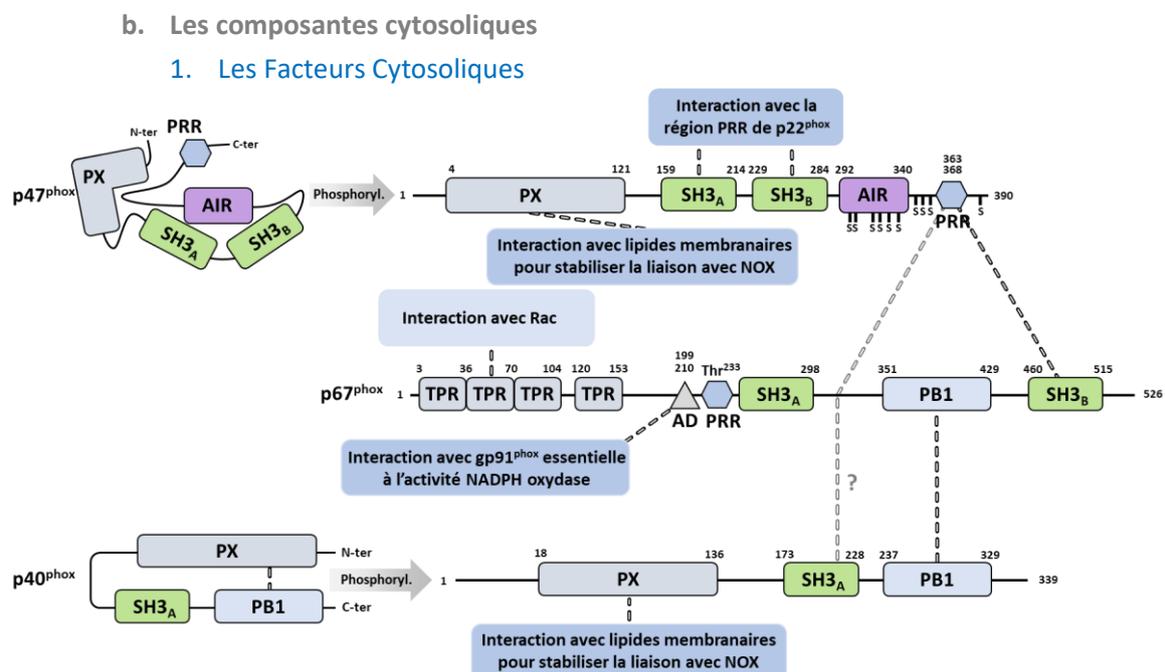


Fig.1.2.7 : Schéma des facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase. Les protéines $p47^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ sont initialement auto-inhibées et nécessitent une phosphorylation pour être dans une conformation active. Les facteurs $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ interagissent ensemble par l'intermédiaire de leur domaine PB1 respectifs et se lient au domaine PRR de $p47^{\text{phox}}$ grâce à leur domaine SH3. Après phosphorylation et modification conformationnelle, le tandem SH3 de $p47^{\text{phox}}$ peut interagir avec le domaine PRR de $p22^{\text{phox}}$ pour transférer le complexe $p47^{\text{phox}}$ - $p67^{\text{phox}}$ - $p40^{\text{phox}}$ à la membrane où les domaines PX respectifs de $p47^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ peuvent interagir avec les lipides membranaires. Les domaines TPR de $p67^{\text{phox}}$ peuvent se lier à la protéine G Rac. Les chiffres indiquent les résidus de début et de fin des différents domaines. Thr233 de $p67^{\text{phox}}$ est le site majeur de phosphorylation de $p67^{\text{phox}}$ et les S présents autour du domaine AIR de $p47^{\text{phox}}$ représentent les sérines susceptibles d'être phosphorylées. Les pointillés représentent les interactions inter-domaine. Reproduit depuis [119].

Afin d'assurer une étroite régulation de l'activité NADPH oxydase et ainsi éviter toute production de ROS excessive qui conduirait à une oxydation délétère pour les macromolécules biologiques, au repos, la sous-unité catalytique de NOX2 (flavocytochrome b_{558}), enchâssée dans la membrane, est maintenue physiquement séparée des sous unités cytosoliques $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$, ainsi que des petites protéine G (Rac1 ou 2). Ainsi, l'activation de NOX2 requiert l'assemblage du complexe multiprotéique à travers l'établissement de liaisons interprotéiques, interlipidiques et intramoléculaires, nécessitant la translocation préalable, induite par de multiples phosphorylations, de tous les composants du complexe à la membrane, ainsi que l'activation indépendante de Rac afin de permettre le transfert ultérieur d'électrons et la production de ROS en présence de NADPH [119].

A l'état inactif, les sous unités cytosoliques $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ forment un complexe trimérique soluble au sein duquel les sous unités $p40^{\text{phox}}$ et $p67^{\text{phox}}$ interagissent par leur domaine PB1 respectifs (Fig.1.2.7), et ont chacune la possibilité de s'associer avec la sous-unité organisatrice $p47^{\text{phox}}$ par le biais d'une interaction de leur domaine SH3 C-ter respectif avec le motif polyproline (PRR) de $p47^{\text{phox}}$ [120]

L'activation requiert la phosphorylation de $p47^{\text{phox}}$, à la suite de laquelle intervient un changement conformationnel permettant de démasquer une région d'interaction initialement auto-inhibée au sein de la sous-unité. En effet, la libération du tandem de SH3 au sein de $p47^{\text{phox}}$ suite au changement de conformation permet désormais l'interaction de $p47^{\text{phox}}$ avec la région PRR de $p22^{\text{phox}}$, permettant l'assemblage du cœur catalytique NOX2 avec les sous unités activatrices à la membrane et l'activation subséquente du complexe NADPH oxydase conduisant au transfert d'électrons et à la production de ROS [121]. Contrairement à la sous-unité $p67^{\text{phox}}$, essentielle à l'activation de NOX2, les études en système acellulaire ont révélé que la protéine organisatrice $p47^{\text{phox}}$ n'était pas indispensable à l'activité, et exerçait principalement un rôle organisateur, de recrutement des différents partenaires cytosoliques pour regrouper ceux-ci à la membrane *in vivo* [122].

Suite aux phosphorylations de $p47^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$, les changements conformationnels induisant l'exposition de leur domaine PX respectifs permettent également une interaction du complexe trimérique $p47^{\text{phox}}$ - $p67^{\text{phox}}$ - $p40^{\text{phox}}$ avec les lipides (PIP)₃ de la membrane.

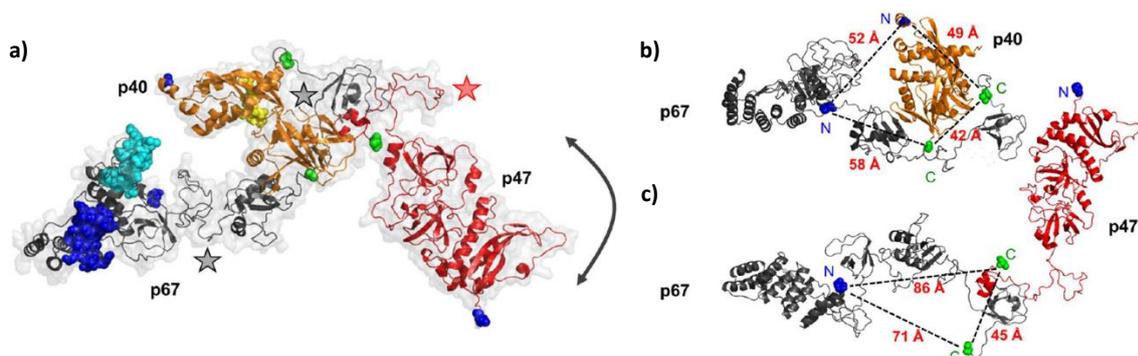


Fig.1.2.8 : Modèle du complexe cytosolique de la NADPH oxydase à l'état inactif [120]. (a) Modèle 3D de l'hétéro-trimère : $p40^{\text{phox}}$ (orange), $p47^{\text{phox}}$ (rouge), $p67^{\text{phox}}$ (gris). Les extrémités N-ter sont indiquées en bleu et les C-ter en vert. La flèche symbolise la flexibilité du domaine N-ter globulaire de $p47^{\text{phox}}$. Les étoiles indiquent les régions flexibles dans $p67^{\text{phox}}$ (noir) et dans la partie C-terminale de $p47^{\text{phox}}$ (rouge). Dans $p67^{\text{phox}}$, les sphères bleues et cyan représentent respectivement l'épingle β de la liaison Rac et les domaines d'activation. Les résidus des domaines PX interagissant avec les lipides dans $p40^{\text{phox}}$ sont représentés par les sphères jaunes. Les interactions par paires sont indiquées (b) entre $p40^{\text{phox}}$ et $p67^{\text{phox}}$ et (c) entre $p47^{\text{phox}}$ et $p67^{\text{phox}}$.

Récemment, la caractérisation intégrative du complexe $p47^{\text{phox}}$ - $p67^{\text{phox}}$ - $p40^{\text{phox}}$ [120] combinant des études par imagerie FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster), par FCSS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) ainsi que par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), a permis de développer un modèle structural du trimère cytosolique (Fig.1.2.8) mettant en évidence la forme allongée du complexe contenant une région flexible séparant deux domaines idéalement positionnés

de part et d'autre de l'hétéro-trimère pour l'activation de la NADPH oxydase et l'interaction avec les composantes membranaires.

2. Les protéines G

L'activation du complexe NADPH oxydase phagocytaire nécessite également la présence des protéines G monomériques à activité GTPase Rac et Rap1A. Les protéines de cette famille peuvent, sous la régulation de facteurs d'échange GEF (Guanosine Exchange Factor), adopter deux conformations alternatives, correspondant respectivement à l'état inactif lorsqu'elles sont liées au GDP, ou à l'état activé en présence de GTP.

Alors que Rac existe sous deux isoformes Rac 1 et Rac 2, exprimées indifféremment dans les deux versions au sein des monocytes et macrophages, Rac2 constitue la forme prédominante au sein des neutrophiles humains, et participe ainsi directement à l'activation de NOX2 [123]. En plus d'un domaine N-terminal de liaison au GDP/GTP, Rac présente une région polybasique C-terminale permettant, après prénylation, l'ancrage de la GTPase à la membrane plasmique.

Cependant, en absence de signal d'activation, Rac est séquestrée dans le cytosol par son association avec la protéine RhoGDI (Rho GDP-dissociation Inhibitor), qui masque alors la queue géranylgeranyl de Rac au sein d'une poche hydrophobe (Fig.1.2.9) [124].

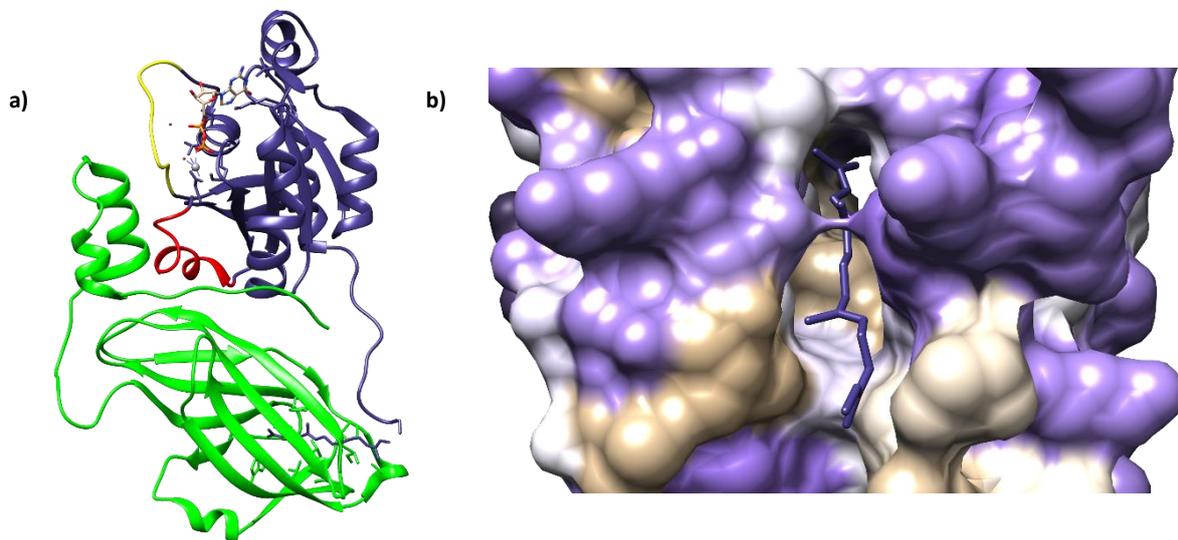


Fig.1.2.9 : Structure cristalline de Rac en interaction avec RhoGDI. La structure a été résolue par diffraction des rayons X à une résolution de 2.7Å. (a) Rac est représenté en bleu et RhoGDI en vert, la queue géranylgeranyl de Rac est représentée en bâton au sein de RhoGDI. (b) La queue géranylgeranyl (bleu) est localisée au sein d'une cavité hydrophobe formée par RhoGDI représenté en surface sur laquelle les régions hydrophiles sont indiquées en violet et les régions hydrophobes en orange.

Après phosphorylation, RhoGDI est relarguée, entraînant ainsi un changement conformationnel de Rac autorisant l'échange GDP/GTP et l'exposition de la queue géranylgeranyl, déclenchant ainsi le recrutement de Rac à la membrane [123], indépendamment des autres facteurs cytosoliques. Celle-ci peut alors établir une interaction directe avec NOX2 par l'intermédiaire d'une série d'acides aminés spécifiques situés dans la région comprise entre les résidus 124 et 135 de Rac [125], ainsi qu'avec le motif TPR (Tetratricopeptide Repeat) N-ter de p67^{phox}.

Rap1A, découverte par co-purification avec le cytochrome b_{558} , constitue également une petite protéine G [126]. De manière similaire à Rac, Rap1A présente un domaine de liaison au GDP/GTP ainsi qu'un motif de prénylation permettant l'ancrage à la membrane, et un motif dont la phosphorylation par la PKA (Protein Kinase A) conduit à l'inhibition de l'association de Rap1A avec le flavocytochrome b_{558} [111]. Le rôle exercé par Rap1A dans l'activité du complexe de la NADPH oxydase n'est pas encore totalement identifié, cependant la perte d'activité oxydase constatée après immuno-déplétion de Rap1A en système acellulaire suggère un rôle de régulateur positif [127].

3. Les mécanismes d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire

A. L'activation

La NADPH oxydase phagocytaire est activée suite à la détection de pathogènes par les macrophages résidents dans les tissus qui déclenchent, au niveau du foyer d'infection, la production de molécules activatrices chimio-attractantes pro-inflammatoires [128]. En réponse à ces signaux, les neutrophiles quittent alors la circulation sanguine afin de rejoindre l'épicentre d'inflammation selon le gradient de chimio-attractant pour permettre la capture puis l'internalisation des pathogènes dans le phagolysosome.

La reconnaissance de l'antigène par les membranes des leucocytes peut ensuite être effectuée soit par l'interaction directe de motifs conservés au cours de l'évolution caractéristiques des microorganismes (PAMP) avec des récepteurs membranaires de type PRR (Pattern Recognition Receptors) tels que les TLR (Toll-like Receptor) ou MMR (Macrophage Mannose Receptors) (CLR (C-type Lectin Receptor) et récepteurs scavengers) [129], soit par l'intervention de molécules intermédiaires, les opsonines, qui recouvrent la surface des cellules pathogènes exerçant ainsi un rôle adaptateur (Anticorps, molécules du complément) [130].

La reconnaissance déclenche l'internalisation des pathogènes par la cellule hôte initiant ainsi des cascades de signalisation cellulaires aboutissant à l'activation de NOX2 par le recrutement à la membrane des divers partenaires du complexe de la NADPH oxydase. Ce processus s'achève par le déversement dans le phagosome de peptides antibactériens, de protéases ainsi que de ROS ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} et HOCl) participant à la destruction des bactéries.

B. Le Priming

Préalablement à l'activation, la NADPH oxydase peut être pré-stimulée par des activateurs externes (priming) tels que le PAF⁵ (Platelet Activating Factor) [131], le fMLF⁵ (formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine) [132], le LPS (Lipopolysaccharide) et le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) [133], ou par des stimuli particuliers tels que des bactéries opsonisées. Cette pré-activation, bien que ne conduisant pas le déclenchement du burst oxydatif, permet, lors de l'activation complète du complexe induite par un stimulus secondaire, la potentialisation de la production de ROS qui est alors plus rapide et amplifiée, permettant ainsi d'assurer une élimination efficace des pathogènes lors de la phagocytose. Cependant, ce processus peut également être à l'origine de dommages oxydatifs au sein des tissus lorsque la durée ou le niveau d'exposition n'est pas adapté.

Afin de limiter les conséquences délétères liées à une suractivation du complexe, la production de ROS par la NADPH oxydase doit ainsi être soumise à une régulation temporelle et spatiale fine [9]. Bien qu'il ait été proposé que la régulation pourrait être assurée à travers la modulation de l'affinité du cytochrome b_{558} pour le NADPH, des marquages spécifiques ont établi que l'interaction d'analogues du NADPH avec le cœur catalytique des NOX était similaire au sein de neutrophiles au repos ou à l'état activé [75].

C. Phosphorylation des sous unités du complexe NADPH oxydase

La régulation de l'activité de NOX2 nécessite l'intervention, au sein des diverses sous-unités régulatrices du complexe, de multiples phosphorylations réalisées par les kinases PKC (Protein Kinase C) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), dont l'activation est médiée par une cascade de signalisation spécifique.

⁵ In vitro, ces agents inflammatoires physiologiques peuvent induire, à basse concentration ($<10^{-7}M$), un effet de priming, ou déclencher l'activation directe des neutrophiles et la production de ROS à des concentrations supérieures.

Au repos, les deux domaines SH3 de p47^{phox} sont masqués par interactions intramoléculeaires avec la région C-terminale auto-inhibitrice AIR [117, 134] rendant ceux-ci inaccessibles à toute interaction interprotéique. Après reconnaissance de pathogènes, la phosphorylation de multiples résidus sérines, notamment au sein du motif AIR de p47^{phox} [135, 136] telles que les sérines 303, 304 et 328, déclenche le démasquage du tandem de SH3, autorisant ainsi son interaction avec le domaine PRR de p22^{phox} participant au maintien de p47^{phox} à la membrane (Fig.1.2.10).

Enfin des études *in vitro* ont montré que la phosphorylation de p47^{phox} renforce la liaison de p67^{phox} au cytochrome *b*₅₅₈.

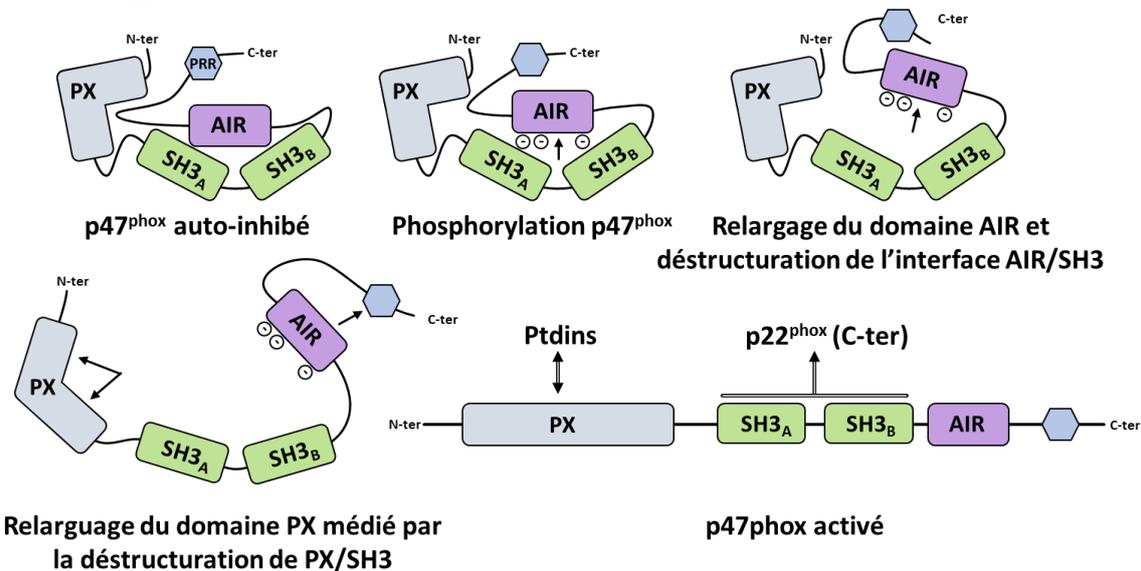


Fig.1.2.10 : Modèle du mécanisme d'activation de p47^{phox} montrant le lien entre les relargages des motifs AIR et PX. La phosphorylation du domaine AIR conduit au relargage de ce dernier et la perte de l'auto-inhibition du tandem SH3 aboutissant au relargage du domaine PX et à l'activation de p47^{phox} [121]

Le facteur p40^{phox} présente deux sites majeurs de phosphorylation ciblés par PKC respectivement au niveau des résidus Thr154 [137], dont la phosphorylation de Thr154 est indispensable à l'activation des NADPH oxydases, et Ser315.

Le facteur cytosolique p67^{phox} subit une phosphorylation par la MAPK au niveau de l'acide aminé Thr233 de la région PRR, comme montré par les études réalisées en présence d'inhibiteurs spécifiques de cette kinase [138].

Les composantes membranaires du complexe NADPH oxydase sont également la cible de phosphorylations multiples lors de l'activation. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKC (GF109203X), a permis de démontrer l'implication de celle-ci dans la phosphorylation du domaine déshydrogénase C-terminal de NOX2, entraînant l'amélioration du transfert d'électrons au sein du flavocytochrome *b*₅₅₈ ainsi que le renforcement la liaison du domaine cytosolique avec les facteurs Rac2, p67^{phox} et p47^{phox} [135].

Récemment, des travaux ont permis de révéler l'existence d'une phosphorylation par l'ATM kinase (Ataxia-Telangiectasia Mutated kinase) de la Ser486 de NOX2, localisée au niveau de la région NIS (NOX Insertion Sequence) du domaine DH de NOX2. Contrairement à ce qui avait été observé pour les PKC, l'inhibition des ATM kinase a conduit à l'augmentation de l'activité catalytique des NADPH oxydases, suggérant ainsi que la phosphorylation de NOX2 dans les neutrophiles humains par les PKC à cette position favorise l'assemblage du complexe [139]

Enfin l'acide phosphatidique, produit par la phospholipase D, participe également à l'activation de la NADPH oxydase par le biais de la phosphorylation de p22^{phox}.

Les effets antagonistes résultants des événements de phosphorylations induits respectivement par les PKC ou les ATM kinases témoignent ainsi de l'existence d'une régulation fine de la production de ROS lors de la phagocytose.

D. Activation par les lipides et l'acide arachidonique

La stimulation de récepteurs membranaires des neutrophiles entraîne l'activation de la PI3-K (PI3-Kinase), qui transfère un phosphate de l'ATP à l'inositol des phosphatidylinositols membranaires, catalysant ainsi la formation des messagers secondaires essentiels tels que le PI(3)P, ou encore les PIP2 et PIP3. Alors que ces deux derniers sont impliqués dans la régulation de l'activité de la PKC, les phosphoinositides PIP2, PIP3 ou PI(3)P lient respectivement le domaine PX de p47^{phox} ou p40^{phox} avec une haute spécificité. En parallèle, la PI3-K peut aussi activer VAV, une protéine de la famille des GEF impliquée dans l'activation de Rac [140].

Les ions Ca²⁺ libérés par l'action de l'IP3 sur les récepteurs du réticulum endoplasmique, permettent l'activation de la PLA2 (Phospholipase A2) cytosolique, une enzyme chargée de l'hydrolyse des phospholipides pour produire de l'acide arachidonique (AA). L'acide arachidonique participe alors à la stimulation de l'activité de plusieurs molécules de signalisation impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase telles que les PKC [141]. Il est requis pour une production optimale de superoxydes et semble agir par induction de changements conformationnels du cytochrome b₅₅₈ [142] notamment des facteurs cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox}. De plus, cet agent amphiphile peut entraîner la rupture des liaisons intramoléculaires auto-inhibitrices de p47^{phox} facilitant ainsi l'interaction avec p22^{phox} [143]. Enfin il a été montré chez des neutrophiles n'exprimant pas Rac2, que l'apport exogène d'acide arachidonique conduisait à l'activation de la NADPH oxydase, suggérant que l'acide arachidonique puisse se substituer au rôle de Rac sur p67^{phox}.

4. Les homologues et isoformes des NOX

Bien que longtemps considérée comme une particularité restreinte aux leucocytes pour exercer son rôle dans l'immunité, la production de ROS de manière spécialisée par la NADPH oxydase constitue un processus qui apparaît essentiel et intervient, à travers l'expression de diverses isoformes de NOX localisées dans une grande variété de cellules et tissus et optimisées pour exercer leur fonctions spécifiques, dans de nombreux mécanismes physiologiques centraux tels que la régulation de la pression vasculaire, l'équilibre, la croissance cellulaire, l'apoptose, la fertilité ainsi que l'angiogenèse.

A. NOX1-NOX3

NOX1 et NOX3, composées, de manière similaire à NOX2, d'un domaine N-terminal transmembranaire comportant 6 hélices alpha chélatant deux groupes héminiques grâce aux motifs bis-histidyls conservés au sein des hélices 3 et 5, et d'une région cytosolique C-terminale exposant les sites de liaison au NADPH et FAD, constituent les isoformes les plus proches de la NADPH oxydase phagocytaire (Fig.1.2.11 et Tab.1.2.2). En effet, celles-ci partagent 60% d'identité de séquence avec NOX2. En conditions physiologiques, l'activation de NOX1 et NOX3 nécessite la présence des facteurs cytosoliques NOXO1β/γ et NOXA1, homologues respectifs aux sous unités p47^{phox} et p67^{phox} de NOX2 [144, 21].

Cependant, les études *in vitro*, démontrent que l'activation de NOX1 et NOX3 peut également être assurée en substituant NOXO1 et NOXA1 par p47^{phox} et p67^{phox}, suggérant ainsi que les isoformes ne présentent pas de spécificité fonctionnelle absolue envers les diverses versions de facteurs cytosoliques, et que l'interaction semble ainsi conditionnée par l'accessibilité à l'une ou l'autre des formes au moment de l'activation [144, 21].

Initialement désignée comme Mox1 pour « Mitogenic oxydase », en raison de son rôle initialement proposé dans la prolifération cellulaire et la mitogenèse, NOX1 a été le premier homologue de NOX2 découvert. Elle constitue l'isoforme prédominante au niveau du colon, de la prostate, de l'utérus et des cellules vasculaires.

NOX3 est quant à elle principalement localisée dans l'oreille interne, où elle participe à la formation d'otolites, de petites structures minéralisées nécessaires à l'équilibre et à la perception de la gravité. NOX3 a été également identifiée en faible quantité dans le cerveau et les poumons, au sein desquels sa fonction est restée à ce jour non élucidée [21].

B. NOX4

NOX4, fortement exprimée dans les reins, les fibroblastes ostéoclastes et les cellules endothéliales, partage un cœur catalytique commun avec NOX1 à 3, mais présente seulement 39% d'identité avec NOX2. L'utilisation de cellules embryonnaires ainsi que de reins invalidés pour l'expression de p22^{phox} à l'aide de l'outil CRISPR/CAS9 a permis de montrer que l'activation et la maturation de NOX4 est strictement dépendante de la présence de p22^{phox} [145].

Cependant, contrairement aux autres isoformes, NOX4 est constitutivement active indépendamment de toute association avec des facteurs solubles tels que p67^{phox}/NOXO1 et p47^{phox}/NOXA1. Bien que cette activité constitutive soit probablement régulée directement par la localisation cellulaire de NOX4, l'intervention dans la régulation du complexe de facteurs d'activation inhabituels tels que des protéines disulfides isoméras (PDI), ou du facteur Poldip2 (Polymerase- δ Interacting Protein 2) [146] a été suggérée par l'identification de ceux-ci après colocalisation des sous-unité p22^{phox} et NOX4.

Une autre spécificité de NOX4 réside dans sa capacité à produire directement, sans phénomène d'interconversion, du peroxyde d'hydrogène. Cette caractéristique semble être attribuée à la présence d'une histidine particulière (H222) au sein de la boucle E extracytoplasmique de NOX4. En effet, il a été observé que la mutation ponctuelle de cette histidine inhibe la production d'H₂O₂ [147].

C. NOX5

NOX5 constitue le plus récent des membres à avoir été caractérisé parmi la famille des NADPH oxydases. Elle partage une architecture commune avec les autres isoformes, avec un module composé d'un domaine transmembranaire FRD similaire à NOX2, ainsi que d'un domaine déshydrogénase de type FNR, auquel est ajoutée une extension N-ter spécifique constituée de 4 mains EF ainsi que de motifs hélice-boucle-hélice, impliqués dans la fixation d'ions calcium. D'autres spécificités par rapport aux autres isoformes de la famille des NOX ont été associées à NOX5, qui partage seulement 27% d'identité avec NOX2, telles qu'une activation dépendante des ions Ca²⁺ et indépendante de p22^{phox} ainsi que des facteurs cytosoliques et enfin une absence de glycolisation [148].

En effet, l'activation de NOX5 ne nécessite aucun facteur membranaire (p22^{phox}) ou cytosolique, mais la régulation de celle-ci par le calcium confère à cette isoforme une importante sensibilité au changement de concentration d'ions Ca²⁺ libres, comme démontré au cours d'études rapportant l'incapacité de NOX5 à produire des ROS en absence de Ca²⁺. En effet, la liaison des ions calcium aux motifs EF-hand conduit à un changement conformationnel de ce domaine qui expose des régions hydrophobes, alors capables d'interagir avec le cœur catalytique pour activer le transfert d'électrons [149]. Cependant, en raison de la quantité importante d'ions Ca²⁺ requise pour l'activation de NOX5, l'intervention de systèmes complémentaires impliquant des protéines de régulation telles que la calmoduline, une protéine ubiquitaire capable de lier les ions calcium [150], est nécessaire afin de faciliter la production de ROS en présence de faibles concentrations de Ca²⁺. La présence d'un site d'interaction à la calmoduline a ainsi été identifié au sein de la région C-terminale de NOX5. De manière similaire aux autres isoformes de NADPH oxydases, NOX5 est régulée par diverses modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations et oxydations. En revanche, contrairement à NOX2, NOX5 ne présente pas de glycosylation [151]. Enfin des études de co-précipitation ont montré la capacité de NOX5 à former, par l'intermédiaire d'interactions entre deux domaines déshydrogénases, un homodimère fonctionnel [148].

D. DUOX1/DUOX2

L'observation, au niveau des cellules thyroïdiennes, d'une production de peroxyde d'hydrogène conjointement dépendante du NADPH et du Ca^{2+} a conduit à la découverte en 1999 de deux membres supplémentaires au sein de la famille des NADPH oxydases, identifiés comme les dual oxydases DUOX1 et 2 [93], et ainsi désignées en raison de la présence à l'extrémité N-ter extracellulaire d'un domaine additionnel homologue des peroxydases, dont le prototype est également susceptible de lier un hème, situé de façon adjacente au site de production extracellulaire des ROS. Bien qu'il ait été suggéré que le domaine peroxydase utilise l' H_2O_2 formé par la dismutation des ions superoxydes générés par le domaine NADPH oxydase des DUOX, certaines études semblent montrer que le domaine peroxydase ne présente pas d'activité catalytique intrinsèque, en accord avec l'absence de résidus histidines nécessaires à la chélation d'un hème au sein de la séquence du domaine de type peroxydase des DUOX. De plus, la comparaison de la topologie de DUOX avec le prototype correspondant au cœur catalytique de NOX1-4, montre la présence, en aval du domaine de type peroxydase, d'une hélice α transmembranaire additionnelle à laquelle succèdent deux domaines intracellulaires de liaison au Ca^{2+} participant, par analogie avec NOX5 à la régulation des DUOX par le calcium.

L'activation des DUOX nécessite également le recrutement de facteurs de maturation, DUOX1 et DUOX2, permettant d'adopter une conformation compatible à l'acquisition de modifications post-traductionnelles responsables de la migration du complexe depuis le réticulum endoplasmique, où celui-ci demeurerait accumulé à l'état inactif, vers la membrane plasmique. Contrairement aux NOX1, 2, 3 et 5, l'activation des DUOX ne conduit pas à la production exclusive d' $\text{O}_2^{\cdot-}$. Il a en effet été rapporté qu'en présence de DUOX2, l'enzyme DUOX1 produit de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ tandis que DUOX2 produit également de l' H_2O_2 [152]

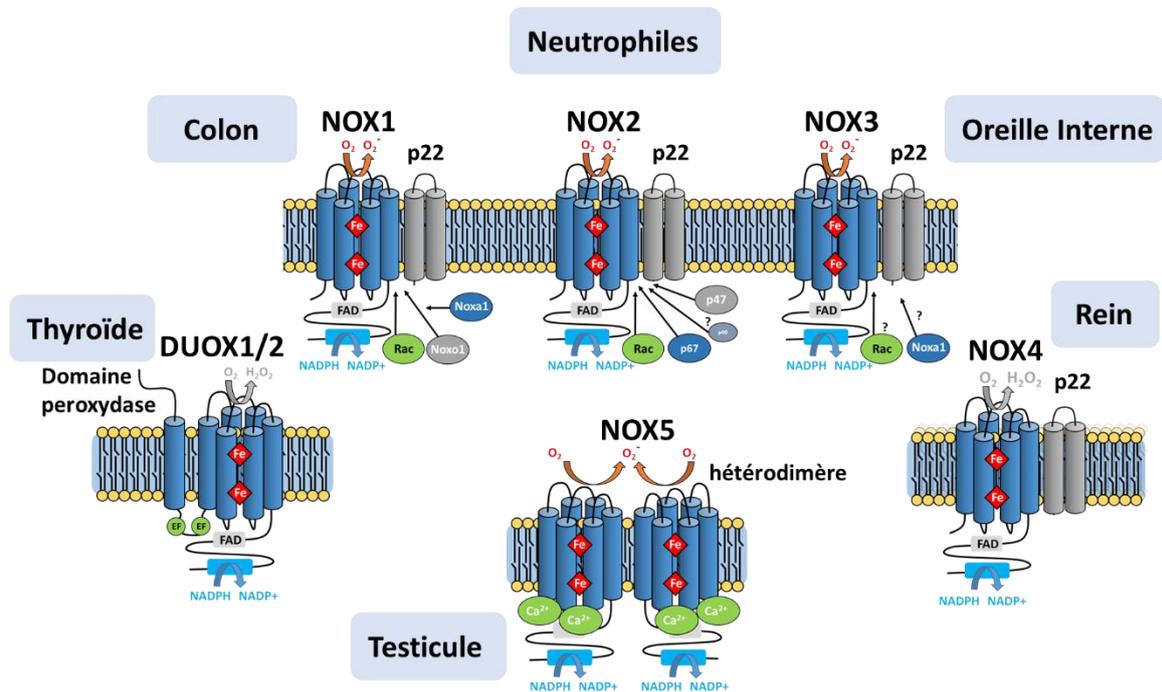
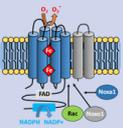
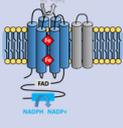
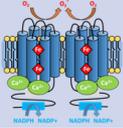
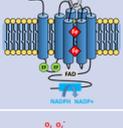
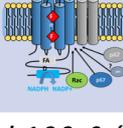


Fig.1.2.11 : Représentation des isoformes de la NADPH oxydase. Malgré leur structure et leur fonction enzymatique similaire, les enzymes de la famille NOX diffèrent par leur mécanisme d'activation. L'activité de NOX1 nécessite $p22^{\text{phox}}$, NOXO1, NOXA1 et la petite GTPase Rac ; NOX2 nécessite $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ et Rac. La phosphorylation de $p47^{\text{phox}}$ est requise pour l'activation de NOX2. Bien que cela ne soit pas absolument nécessaire *in vitro*, $p40^{\text{phox}}$ s'associe également à ce complexe et peut contribuer à l'activation. NOX3 nécessite $p22^{\text{phox}}$ et NOXO1, la nécessité de NOXA1 peut différer selon l'espèce considérée, et la nécessité absolue de l'association de Rac au sein du complexe n'est pas clairement établie. Sous la dépendance de $p22^{\text{phox}}$, NOX4 est constitutivement active. Le ROS produit par NOX4 est l' H_2O_2 . NOX5, DUOX1 et DUOX2 sont activés par les ions Ca^{2+} et ne semblent pas nécessiter de sous-unités. Le ROS produit par les DUOX1 et 2 est l' H_2O_2 [19].

Structure	Iso.	Stimulus	Voie de signalisation	Fonctions	Type(s) cellulaire(s) localisation
	Nox1	H2O2	ERK 1/2/cycline D1	Prolifération	Fibroblaste Cellules épithéliales pulmonaires
		Thrombine	n.d.		Cellules musculaires lisses vasculaires
		Angiotensine II	P38 MAPK/MAPKA PK2 Akt	Hypertrophie	Cellules musculaires lisses vasculaires
		PDGF	(1) c-Src/PDK1/PAK1 (2) SSH1L/cofiline	Migration	
		FGF	INK/paxiline		
		TNF-a	INK/p38 MAPK/AP-1	Nécrose	Cellules épithéliales du côlon
		LPS - Flagelline	n.d.	Défense de l'hôte	
Nox3	cisplatine	Canal TRPV 1	Ototoxicité	Oreille interne	
	Nox4	IGF-1	MMP2	Migration	Cellules musculaires lisses vasculaires
		PDGF	Adhésion focale		
		Angiotensine II	Akt	Survie et croissance	Cellules mésangiales
		TNF-b	pRb/cd c2		Cellules musculaires lisses des voies aériennes
		Insuline	MMK-1/Erk 1/2	Différenciation	Adipocytes
	Nox5	IL-4	IP3/Calcium	Expression génique	Cellules épithéliales alvéolaires
		PDGF	JAK2/STAT3	Prolifération	Cellules musculaires lisses vasculaires
	Duox1	n.d.	n.d.	Iodation des hormones	Thyroïde
	Duox2	n.d.	Bactéricide via lacto peroxydase	Défense et inflammation	Voies aériennes
	Nox2	Micro-organismes Cytokines	H2O2 → [•] OH	Défense de l'hôte	Neutrophiles
		ATP	ASK1/p38 MAPK	Apoptose	Macrophages
		TNF-a	NF-kb	Nécrose	Fibroblastes
		VEGF	C-Ser/Akt/CE-cadhérine	Angiogénèse	Cellules endothéliales

Tab.1.2.2 : Spécificités des différentes isoformes eucaryotes de la famille des NADPH oxydases

3

Implication des NOX dans les processus physiologiques

Les ROS sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que la défense immunitaire ou encore dans certaines voies de signalisation cellulaire. En tant qu'enzymes spécialisées dans la production de ROS, les membres de la famille des NADPH oxydases sont directement impliqués dans ces processus. Dans cette partie, les différentes implications physiologiques directement concernées par l'activité des NADPH oxydases seront détaillées afin d'illustrer le rôle pléiotropique de ces enzymes.

1. Implication dans la défense de l'hôte et l'inflammation

La défense immunitaire est une fonction majeure assurée par les NADPH oxydases, comme en témoignent les études initiales sur la granulomatose sceptique chronique (CGD). Cependant, alors que la production de ROS par les NOX a pendant longtemps expliqué la totalité du processus de destruction des pathogènes, il est désormais établi que la réussite d'une élimination médiée par les ROS résulte en réalité d'une coopération complexe entre différents mécanismes [153, 18]. De plus, les études ont mis en évidence de nouveaux mécanismes phagocytaires indépendants du facteur bactéricide des ROS et nécessitant une modulation par les NOX [154, 97, 19].

A. La phagocytose : Elimination des pathogènes dépendante des ROS

a. Dégradation des pathogènes par la cascade de ROS $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/HOCl$

L'étude des phénomènes intervenant dans la défense immunitaire lors la phagocytose, notamment à travers la caractérisation du mécanisme de burst oxydatif, a permis la réalisation d'avancées majeures au sujet de NOX2 et plus généralement de la famille des NADPH oxydases.

Lors de l'infection bactérienne, des composés chimiotactiques tels que les fLMF, se lient à la surface des neutrophiles, où les chimiokines IL-8 sont respectivement relâchées par les premiers pathogènes dégradés [155] ou par les cellules immunitaires sentinelles [156]. En réponse à ces signaux, les neutrophiles quittent la circulation sanguine et traversent les parois des capillaires pour rejoindre le lieu de l'inflammation où ils débent, grâce à différents récepteurs exprimés à leur surface, des étapes de reconnaissance et d'adhérence à l'agent pathogène. Ceux-ci initient ensuite la formation de phagosomes capables d'internaliser les micro-organismes, ainsi que la production d'enzymes lytiques contenues dans des granules cytoplasmiques. La fusion des vésicules avec le phagosome conduit au déversement d'un mélange de peptides et de protéines bactéricides permettant la dégradation des organismes pathogènes. En parallèle, le déclenchement de cascades de signalisation aboutit à l'activation du complexe de la NADPH oxydase conduisant à la production d'anions superoxydes [128, 11] rapidement convertis en dérivés bactéricides, tels que l' $HOCl$ [153, 69]. L'action conjointe de ces dérivés et des enzymes lytiques contenues dans les granules cytoplasmiques du neutrophile aboutit alors à la destruction des pathogènes pris en charge (Fig.1.3.1).

b. Régulation du pH phagosomal

Le transfert d'électrons catalysé par la NADPH oxydase à travers la membrane devrait conduire à une accumulation de charges négatives dans l'espace intraphagosomal, induisant alors une différence de potentiel accrue de part et d'autre de la membrane. Lors de l'oxydation du NADPH en $NADP^+$, ce phénomène serait encore accentué par la libération de protons dans le cytosol, créant ainsi une barrière thermodynamique importante à l'activité NADPH oxydase [157, 158]. Dans ces conditions, la réalisation du burst oxydatif serait alors impossible. En réalité, le fonctionnement de la NADPH oxydase

se révèle conditionné par l'établissement d'un transfert électrogénique à l'échelle du phagosome [157].

Afin d'expliquer ce mécanisme, l'existence d'un canal à protons directement couplé au sein du domaine transmembranaire des NOX et permettant un transfert de H^+ concomitant à celui des électrons, a été longtemps envisagé et documenté par divers travaux [85]. Cependant, cette hypothèse a finalement été invalidée au profit de l'existence, au sein des neutrophiles, de canaux à protons indépendants assurant un flux de H^+ en direction de l'espace luminal du phagosome [159, 140]. En effet, ces canaux se sont révélés capables de compenser 95% des transferts électroniques engendrés par les NOX, en plus de contribuer à la régulation du pH phagosomal assurant le maintien de l'activité optimale des protéases contenues dans le phagosome, et enfin de fournir les ions H^+ nécessaires à la conversion d' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et en HOCl [59, 160] (Fig.1.3.1).

Par ailleurs, des travaux proposent également l'implication de cations K^+ dans la compensation de la charge électronique. Ceux-ci pourraient en effet permettre la libération des protéases attachées à la membrane granulaire négativement chargée et ainsi augmenter l'activité protéolytique contre le microorganisme phagocyté [161, 162] (Fig.1.3.1).

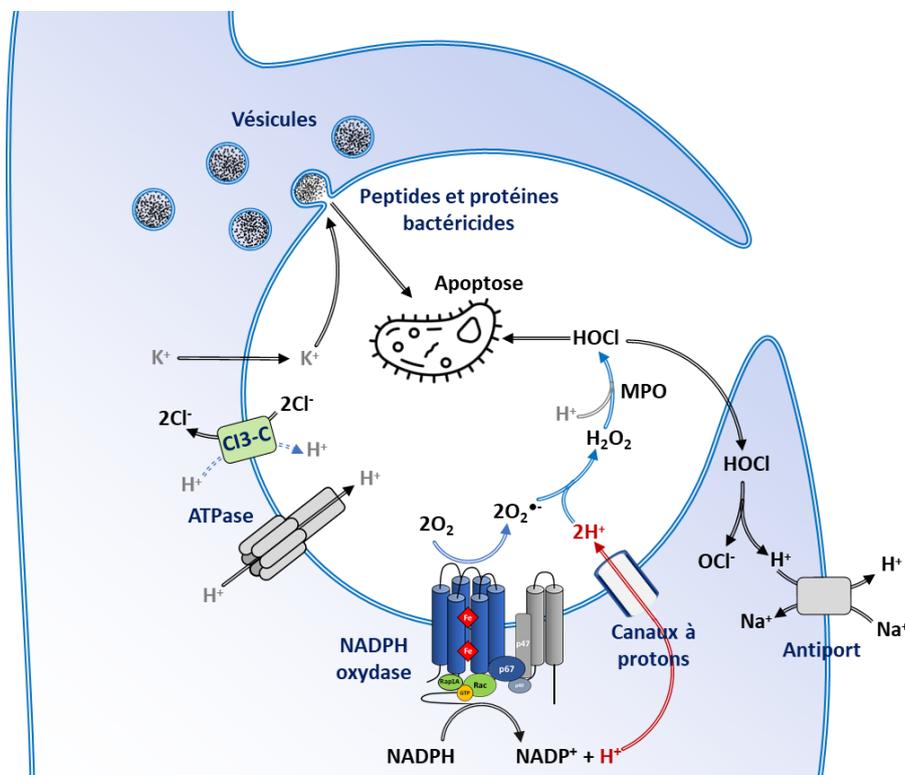


Fig.1.3.1 : Rôles principaux des ROS produits par les NOX lors du burst oxydatif. Au cours de la phagocytose, une bactérie est séquestrée dans le phagosome déclenchant le déversement de plusieurs types de vésicules qui libèrent leur contenu bactéricide. Les six composants du complexe NADPH oxydase s'assemblent et les électrons du NADPH cytosolique sont transloqués à travers la membrane par un relai FAD puis les groupements hémiques pour réduire l'oxygène en anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) dans le phagosome. Le flux d'électrons est équilibré par le flux de protons à travers les canaux de protons voltage-dépendants. Les H^+ ainsi conduits dans le phagosome contribuent à la conversion de l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 puis en HOCl (MPO) afin de dégrader le pathogène phagocyté. La compensation de la charge électronique par des ions K^+ pourrait également favoriser la libération des protéases afin de potentialiser l'activité protéolytique. D'autres transporteurs pourraient contribuer à la régulation du pH, notamment la Cl3-C (un antiporteur Cl^- / H^+), la H^+ -ATPase et l'antiporteur Na^+ / H^+ . Reproduit depuis [160, 140].

B. Inactivation des facteurs de virulence

En plus de participer à la dégradation directe des pathogènes, les ROS produits par les NOX sont également capables d'inactiver uniquement les facteurs de pathogénicité, en absence de destruction des microorganismes.

Chez certaines bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, le HOCl dérivé de l'anion superoxyde produit par les NOX peut ainsi oxyder et inactiver des peptides impliqués dans le quorum sensing, participant alors à la virulence des microorganismes [163]

C. Limitation de la réponse inflammatoire

Bien que l'action des ROS soit généralement associée à une activité pro-inflammatoire, des études ont mis en évidence un rôle anti-inflammatoire de la NADPH oxydase dans l'inflammation stérile. Celle-ci intervient principalement dans la voie de régulation IL-1 α /G-CSF enclenchant la mobilisation des neutrophiles dans les lésions tissulaires (Fig.1.3.2). Une diminution de l'activité enzymatique de la NOX entraîne une surproduction locale et précoce d'interleukine IL-1 α dans les tissus lésés et induit alors la production de G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) par les cellules du foyer inflammatoire, contribuant ainsi au recrutement des neutrophiles et, *in fine*, à une inflammation prolongée [164].

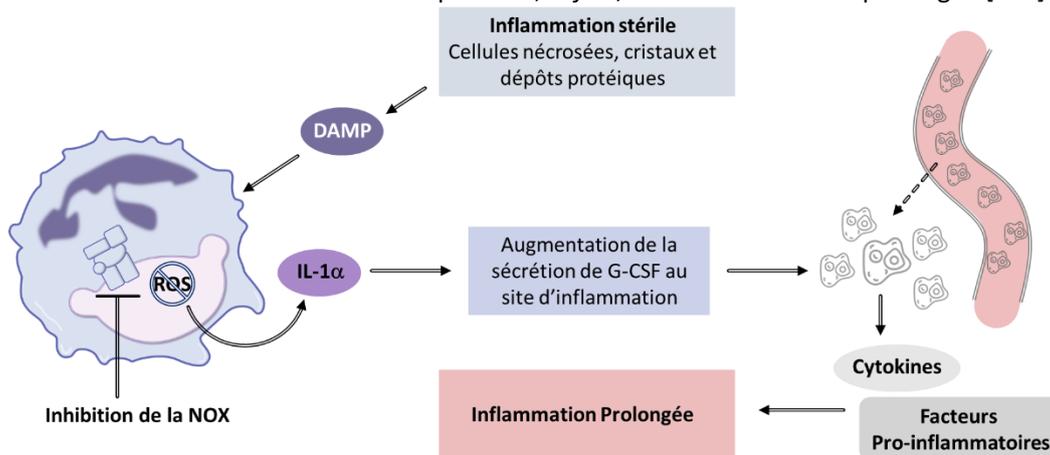


Fig.1.3.2 : Mécanisme de l'inflammation en l'absence d'activation de NADPH oxydase. Les motifs moléculaires (DAMP, Danger Associated Molecular Pattern) associés à une inflammation stérile, sont reconnus par des PRR (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires) situés sur les cellules phagocytaires. L'absence ou l'inhibition de l'activité de la NADPH phagocytaire conduit à une surproduction d'IL-1 α par les macrophages résidents dans les tissus lésés favorisant une production locale de G-CSF, qui induit une infiltration excessive de neutrophiles et monocytes au site d'inflammation, conduisant ainsi à une activation de la production de cytokines et de facteurs pro-inflammatoires prolongeant l'inflammation et aboutissant alors à des dommages tissulaires.

D. Activation des NET

Les NET (Neutrophil Extracellular Traps) constituent des réseaux de fibres extra-cellulaires principalement composés d'ADN et de protéines granulaires produits par les neutrophiles pour piéger les micro-organismes afin de limiter la dissémination infectieuse. Les NET présentent également un rôle bactéricide grâce à l'action conjointe de protéines fixées à leur surface, telles que le lysozyme, des protéases, des défensines ou encore des histones, et perturbant la perméabilité de la membrane des cellules bactériennes, conduisant alors à la destruction de celles-ci [165, 166]. Ce processus, désigné par le terme netose, occupe notamment un rôle essentiel lorsque les pathogènes ont une taille trop importante pour être phagocytés par les neutrophiles. Des études ont montré que les patients atteints de CGD étaient incapables de produire des NET, suggérant ainsi l'implication de NOX2 dans l'activation de ces défenses [167]. Des travaux plus récents menés sur des souris déficientes pour l'expression de NADPH oxydase ($p47^{phox/-}$) ont effectivement démontré que la netose requiert la présence de NADPH oxydase fonctionnelle [168].

2. Rôle des NADPH oxydase dans la signalisation cellulaire redox

En plus du physiologique exercé par les ROS dans la réponse inflammatoire, la découverte de l'existence d'isoformes de NOX2 selon diverses localisations au sein de multiples types cellulaires non phagocytaires, associée avec la spécialisation de cette famille d'enzymes dans la génération de ROS,

généralement en réponse à des signaux extracellulaires, évoque un rôle central des NADPH oxydases au sein de la signalisation redox [9].

A. Régulation des voies de signalisation

a. Inhibition des phosphatases

L'oxydation des thiols des résidus cystéines constitue le mécanisme le plus étudié et probablement le plus important par lequel les ROS, notamment dérivés des NOX, participent à la régulation de multiples fonctions cellulaires. Cela a été clairement démontré lors de l'étude des protéines tyrosines phosphatases (PTP) qui contrôlent l'état de phosphorylation d'un grand nombre de protéines de signalisation, et sont ainsi impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie ou encore la motilité [169]. Les cystéines localisées dans la région du site catalytique des PTP sont en effet susceptibles de subir une inactivation oxydative par les ROS [170, 171], conduisant à une perte d'activité phosphatase, engendrant alors l'augmentation du taux de phosphorylation et donc une modulation de la transduction des signaux [172]. En accord avec ce mécanisme d'inactivation, l'implication des ROS produits par les NOX a été révélée dans la régulation de la phosphorylation des protéines au sein de différents types cellulaires [173, 174].

b. Activation des kinases

Les MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase), responsables de la phosphorylation nécessaire à la signalisation cellulaire peuvent être phosphorylées et activées suite à l'exposition des cellules au peroxyde d'hydrogène [19]. De nombreux travaux démontrent que les NADPH oxydases sont responsables de l'activation des composants des MAP kinases [175, 176, 177], en revanche les étapes d'oxydoréduction successives impliquées demeurent encore inconnues. Certaines hypothèses suggèrent cependant que l'activation de ceux-ci soit réalisée par l'intermédiaire de voies de signalisation en amont des kinases ERK1/2 ou par effet indirect lié à l'inhibition de l'activité phosphatase par les ROS [19].

c. Régulation des ions Calcium

La concentration en ions Ca^{2+} constitue un facteur important de la communication cellulaire. Bien que celle-ci soit maintenue, dans les cellules au repos, à un niveau extrêmement faible (100nM) par les pompes à calcium, une large gamme de stimuli est susceptible d'accroître cette concentration à des niveaux micromolaires, résultant alors en une activation des processus dépendant des ions Ca^{2+} . Les travaux sur ces messagers cellulaires ont démontré qu'au moins trois types de protéines (canaux calciques membranaires, canaux de relargage du calcium intracellulaire, et pompe à Ca^{2+}) impliqués dans l'homéostasie du Ca^{2+} étaient régulés par les NOX, à travers des modifications post-traductionnelles dépendantes des ROS (oxydation de cystéine, S-glutathionylation) ou par la dépolarisation des membranes engendrée par le transfert d'électrons [178].

1. Canaux calciques membranaires

Plusieurs transporteurs d'ions calcium sont localisés dans la membrane plasmique et régulés par les ROS dérivés des NOX. L'étude des canaux voltage-dépendants a montré que les ROS dérivés des NOX pouvaient réguler l'afflux d'ions Ca^{2+} par oxydation des résidus cystéines de la sous unité $\alpha 1$ constituant le pore du canal [178] et permettant alors la modulation de l'activité ou des conformations d'ouverture/fermeture du pore (Fig.1.3.2). Ainsi, dans les myocytes ventriculaires, le flux d'ion Ca^{2+} est entièrement supprimé par les ROS [179]. A l'inverse, les ROS produits par NOX1 stimulent l'entrée du Ca^{2+} à travers des canaux de type L ou T situés au niveau des cellules musculaires lisses. Les ions Ca^{2+} impliqués dans la signalisation cellulaire proviennent d'un déversement du réticulum endoplasmique,

constituant la réserve intracellulaire de Ca^{2+} , ou d'un transfert à travers les canaux de la membrane plasmique. Les TRP (Transient Receptor Potential), canaux non sélectifs à cations, et les SOC (Store Operated Ca^{2+}) constituent les deux principaux types de canaux permettant l'afflux d'ions entrants dans la cellule [180]. Dans le cas de l'hypertension pulmonaire, il a été démontré que NOX4 augmente l'expression de TRPC1 et TRPC6 conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire en réponse à la présence de BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4) dans les cellules musculaires souples. De plus, TRPC6 est activé par les ROS générés par NOX2 au niveau de l'endothélium et déclenche l'afflux de Ca^{2+} en réponse à une ischémie pulmonaire [181].

Les espèces radicalaires sont également impliquées dans la modulation du flux entrant d'ions calcium à travers les SOC, régulé par la translocation à la membrane plasmique des récepteurs à Ca^{2+} du RE, STIM1 et STIM2 (Stromal Interaction Molecule) vers la membrane plasmique, à laquelle ils se lient et activent les canaux pour initier l'entrée du calcium permettant la régénération des réserves. La production de peroxyde d'hydrogène par NOX2 induit une S-glutathionylation de STIM1 au niveau de la cystéine C56, conduisant au clustering de STIM1 et à l'activation de canaux SOCE (Store Operated Calcium Entry) [182].

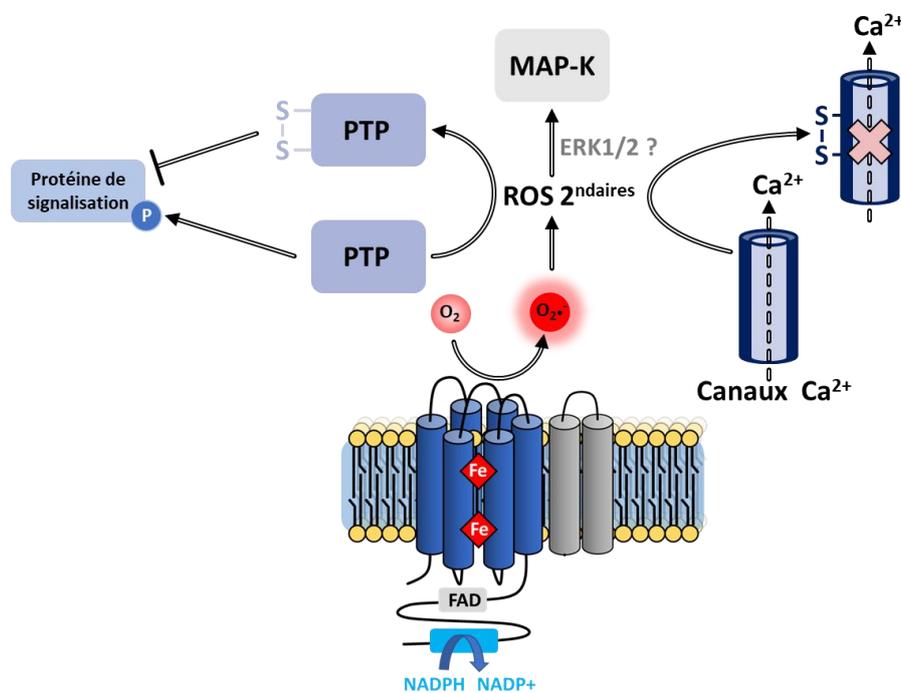


Fig.1.3.3 : Régulation des voies de signalisation des phosphatases, kinases et canaux calciques par les NADPH oxydases. La production par la NADPH oxydase d'anions superoxydes rapidement convertis en ROS secondaires conduit à l'oxydation des cystéines des PTP et des canaux à calcium, aboutissant ainsi à la formation de ponts disulfures inhibant respectivement la phosphorylation d'un grand nombre de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation, ou le flux d'ions Ca^{2+} . Les ROS peuvent également activer les MAP-K, probablement par l'intermédiaire de la voie de signalisation ERK1/2.

2. Relargage des ions calcium intracellulaires

Les ROS sont également capables de stimuler un relargage du Ca^{2+} stocké dans les réserves intracellulaires pour augmenter les niveaux d'ions calcium [183, 184] disponibles. Les canaux impliqués dans ce transfert appartiennent à la famille des récepteurs de la ryadonine (RyR) qui possèdent des résidus cystéines très sensibles aux oxydations médiées par les ROS [185]. L'activation des canaux à Ca^{2+} a été démontré non seulement par l'ajout d' H_2O_2 [186, 187] et d'anions superoxydes exogènes [188], mais également en réponse à la production de ROS dépendante des NOX [189, 190, 191].

Il semblerait cependant que les ROS produits par les NOX n'aboutissent pas nécessairement à une augmentation du niveau intracellulaire global de Ca^{2+} , au profit d'un mode d'action ciblé, désigné par Ca^{2+} sparks [189], conduisant à de rapides afflux transitoires de Ca^{2+} , dont la localisation est restreinte.

Ce mécanisme intervient suite à l'activation de petits clusters de récepteurs de la ryanodine. Les ROS sont aussi impliqués dans l'activation des canaux à Ca^{2+} intracellulaires de la famille des récepteurs à IP3 [192].

3. Pompes calciques

Enfin l'activité des pompes ATPase à Ca^{2+} peut également être modulée par la concentration des ROS selon deux mécanismes distincts [193, 194, 183]

- A faibles concentrations de ROS, la S-glutathionylation des résidus cystéines par interaction du glutathion avec les radicaux peroxy-nitrites conduit à la formation de ponts disulfures réversibles qui stimulent les pompes Ca^{2+}
- Pour des concentrations en ROS supérieures, le niveau élevé de stress oxydant entraîne l'oxydation irréversible des thiols provoquant ainsi l'inactivation des enzymes [183].

d. Régulation de la croissance et de la mort cellulaire

1. Mort cellulaire

Un grand nombre d'études décrivent la mort cellulaire comme une conséquence de l'activation des NOX. Les ROS sont capables de déclencher l'apoptose de manière indirecte par l'intermédiaire des dommages à l'ADN aux protéines et aux lipides, ou plus directement par l'activation de voies de signalisation pro-apoptotique telles que SAPK/JNK, ERK1/2, et p38 grâce à l'activation des MAP-kinases [195]. A hautes concentrations, les ROS, et notamment l' H_2O_2 peuvent inhiber les caspases et ainsi induire une évolution délétère entraînant des dommages irrémédiables aboutissant alors à un phénomène de nécrose au détriment d'un simple phénomène d'apoptose [196, 197].

A l'inverse, dans certain cas, les ROS produits par les NOX peuvent déclencher un effet anti apoptotique par l'activation des voies de communication NF- κ b [198] ou Akt/ASK1 [199]. Il est également suggéré que l'anion superoxyde soit un inhibiteur naturel de la liaison ligand/récepteur FasL/FasR à l'origine de la mort cellulaire [200].

La distinction entre les fonctions pro et anti apoptotiques est modulée par divers facteurs incluant l'intensité et la durée du signal redox, la localisation cellulaire de la NADPH oxydase responsable de la production de ROS au sein des différents compartiments cellulaires, du type de ROS générés et enfin des cibles du signal redox exprimé par la cellule.

2. La croissance cellulaire

Bien que les ROS exercent un rôle dans le phénomène de sénescence cellulaire, l'implication de ceux-ci a également été établie dans la régulation de la croissance cellulaire. La découverte d'une production excessive de ROS par les cellules tumorales en développement [87] a initié la réalisation de diverses études identifiant dans ces processus le rôle de messagers secondaires exercé par les ROS dans la stimulation de la prolifération cellulaire [201, 195, 202, 203]. Cependant, l'origine des ROS impliqués demeure incertaine. Malgré l'absence de défauts de prolifération chez les patients déficients en NOX2, la découverte de nouveaux membres au sein de la famille des NADPH oxydases a conduit à reconsidérer l'intervention potentielle des NOX dans la croissance cellulaire, permettant ainsi l'identification de l' H_2O_2 produit par NOX1 dans la régulation de la prolifération cellulaire [204]. Des études *in vitro* reposant sur la suppression d'ARN antisens ou de petits ARN interférents suggèrent que NOX5 et NOX4/1 interviennent également dans la prolifération, respectivement des cellules musculaires lisses ou des cellules de l'œsophage [205]. De manière similaire, plus récemment, l'inactivation des ARN de p22^{phox} et NOX2 a montré que ces protéines exercent un rôle crucial dans la régulation de la croissance cellulaire.

e. Rôle dans les mécanismes de biosynthèse

La biosynthèse des hormones thyroïdiennes constitue l'un des rôles les plus documentés concernant les NADPH oxydases. Le peroxyde d'hydrogène produit par les protéines DUOX (Dual oxidase) dans la thyroïde est utilisé comme source d'oxydant par la thyroperoxydase dans la catalyse de l'iodation des résidus tyrosines de la thyroglobuline, une protéine de la matrice extracellulaire, aboutissant alors à la synthèse des hormones thyroïdiennes T3 et T4 [93, 94]. Ainsi, en raison de la présence d'une mutation sur le gène codant pour DUOX2 conduisant à l'absence d'H₂O₂, les patients souffrant d'hypothyroïdisme congénital sont incapables de produire les hormones thyroïdiennes [206].

Un second exemple de l'implication des NOX dans des processus de biosynthèses se situe au niveau de l'oreille interne des vertébrés au sein desquels la morphogénèse d'otolithes, des concrétions minérales qui assurent la perception de la gravité et le maintien de l'équilibre, est activée par l'intermédiaire des ROS produits par NOX3 [207].

f. Rôle dans l'angiogénèse

L'angiogénèse constitue un processus finement régulé, au cours duquel de nouveaux capillaires sont formés à partir de vaisseaux sanguins préexistants. Ce processus est modulé par des facteurs pro et anti angiogéniques agissant sur les cellules endothéliales (EC). Des cellules endothéliales initialement au repos sont activées, stimulant alors l'expression de récepteurs aux facteurs de croissance ainsi que le relargage de protéases responsables de la déstabilisation de la membrane. Par la suite, les cellules endothéliales prolifèrent et commencent à bourgeonner, avant de migrer en direction des stimuli angiogéniques pour former des tubules, puis le lumen des vaisseaux. Les NOX 1,2,4 et 5 localisées dans les EC peuvent être activées par les VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), des dérivés de facteurs de croissance (PDGF), les Angiopoïétines 1 et 2 (Ang1, Ang2) et TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand), ainsi que par les conditions induisant l'angiogénèse telles que l'hypoxie et l'ischémie.

1. L'étape de prolifération

Depuis 1999, NOX1 est connue pour son rôle dans la stimulation de la prolifération de différentes cellules incluant les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), mais l'implication de NOX1 dans le développement des cellules endothéliales n'a été révélée que récemment, notamment à travers la démonstration que l'inactivation de NOX1 altérerait la prolifération induite par l'hypoxie des EC des artères pulmonaires [208].

La majorité des travaux actuels attribuant aux NOX un rôle dans la prolifération des EC implique ainsi désormais également NOX2 et NOX4, dont la surexpression induit conjointement la production de ROS et la prolifération des EC, alors que leur inactivation inhibe ces deux processus, établissant ainsi que l'activité des NOX est directement en lien avec ces phénomènes. La croissance des EC microvasculaires humaines peut être aussi être activée par l'induction de NOX4, pouvant être exercée par divers facteurs de croissance tels que VEGF [209], FGF-2, TRAIL [210], or TGFβ1 (Transforming-Growth-Factor-β1) [211, 212]. De plus, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène produit par NOX4 induit également l'activation subséquente de NOX2, aboutissant finalement à l'activation des récepteurs VEGF [212, 213, 214] induisant la prolifération des EC. Ces résultats témoignent donc de l'existence d'une coordination entre les isoformes de NOX nécessaires à l'angiogénèse.

2. L'étape de bourgeonnement

D'après les travaux menés sur l'angiogénèse des tumeurs, le bourgeonnement des EC fait également intervenir les NOX. Ainsi, l'aorte de souris transgéniques surexprimant NOX4 (NOX4 TG) présente un bourgeonnement des EC 25% supérieur aux EC des aortes sauvages [215]. Ang1, un régulateur important dans l'angiogénèse vasculaire, stimule le bourgeonnement des EC. Cependant, ce processus peut être inhibé par l'utilisation d'une large gamme d'inhibiteurs des NOX, ainsi que dans les souris

modèles de CGD $p47^{phox-/-}$, au sein desquelles l'expression du gène de la sous-unité cytosolique est invalidée, démontrant ainsi l'implication des NOX dans la voie de régulation de l'angiogenèse médiée par l'Angiotensine1. De plus, le bourgeonnement des EC constituant un processus modulé par un excès d'oxygène, la réalisation de son déroulement normal rend essentielle l'intervention des facteurs cytosoliques permettant l'activation des NOX, comme le démontre l'absence de stimulation de la croissance des EC au sein de cellules invalidées pour l'expression de $p47^{phox}$ placées en hypoxie [98]. De plus, malgré la stimulation par l'urotensine II, le bourgeonnement des EC au sein de souris $Nox2^{-/-}$ n'a pas été rétabli. L'ensemble de ces travaux contribuent donc à montrer que NOX2, NOX4 et $p47^{phox}$ sont impliqués dans le bourgeonnement des EC.

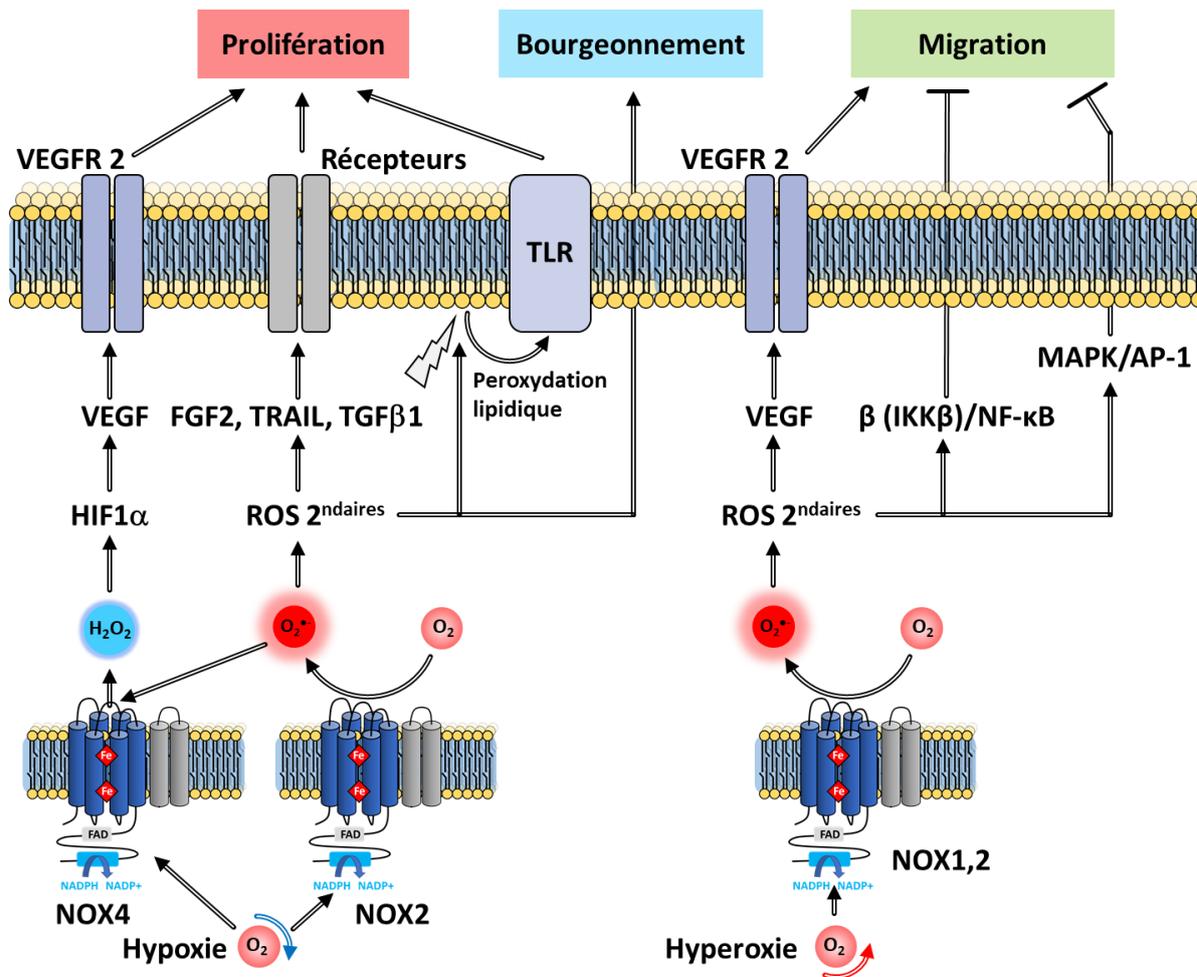


Fig.1.3.4 : Régulation des étapes de l'angiogenèse par les NADPH oxydases. La production par la NADPH oxydase d'anions superoxydes rapidement convertis en ROS secondaires conduit à l'oxydation des cystéines des PTP et des canaux à calcium, aboutissant ainsi à la formation de ponts disulfures inhibant respectivement la phosphorylation d'un grand nombre de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation, ou le flux d'ions Ca^{2+} . Les ROS peuvent également activer les MAP-K, probablement par l'intermédiaire de la voie de signalisation ERK1/2. VEGFR 2 (Vascular Endothelial Growth Factor 2), TLR (Toll-Like Receptor).

3. L'étape de migration et de formation de tubules

Le rôle de NOX1 dans la régulation de la formation des tubules a été décrit grâce aux EC pulmonaires de souris déficientes en NOX1, incapables de produire des ROS après stimulation par les facteurs de croissance VEGF et FGF-2. Dans ces conditions, les EC sont incapables de migrer pour former des tubules. En revanche, l'expression des récepteurs $PPAR\alpha$ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) a été observée dans les cellules déficientes et il a été montré que l'exposition de celles-ci au GW6472, un antagoniste de $PPAR\alpha$, permettait de restaurer les capacités d'angiogenèse. La migration des EC

constitue également un processus stimulé par un excès d'oxygène au sein de l'environnement cellulaire. Ainsi, la désactivation de NOX2 et NOX4, contribuant directement à la génération de telles conditions, empêche la migration des EC médiée par l'hyperoxie. De plus, la désactivation de NOX2, réalisée indifféremment par l'intermédiaire d'un adénovirus, ou l'utilisation de souris modèles *p47^{phox}-/-*, inhibe la stimulation de la migration médiée par Ang1 [216].

D'autre part NOX2, par l'intermédiaire de l'intervention des voies de régulation impliquant IκB kinase-β(IKKβ)/NF-κβ et MAPK/AP-1, contribue également à l'atténuation de la formation des tubules des cellules endothéliales initialement stimulée par le LPS [217]. Enfin, les facteurs dérivés des cellules du stroma (SDF-1α) sont des chimiokines angiogéniques puissantes capables d'induire la migration des EC microvasculaires humaines [218]. Cependant, l'inactivation de *p22^{phox}* ou de NOX5 par les siARN inhibe la migration des EC ainsi que la formation de tubules induite par la migration des SDF-1α [219].

3. Conclusions

L'ensemble de ces études démontre ainsi l'implication des isoformes NOX1-2-4 et 5 ainsi que leurs facteurs cytosoliques respectifs selon divers mécanismes essentiels à l'étape de migration lors de l'angiogenèse.

Les ROS produits par les protéines de la famille des NADPH oxydases interviennent donc dans un vaste ensemble de mécanismes physiologiques, incluant différents processus de la défense immunitaire ainsi qu'une grande quantité de voies de signalisation impliquées dans la régulation de fonctions biologiques essentielles telles que l'angiogenèse, la prolifération cellulaire ou l'apoptose. La perte d'homéostasie des ROS conduisant au stress oxydant peut donc impacter l'ensemble de ces processus et conduire à des pathologies sévères sur le corps humain.

4

Pathologies liées à la dérégulation des NOX

L'implication des ROS produits par les NOX a été étendue à différents processus physiologiques cruciaux tels que la signalisation cellulaire, l'angiosynthèse ou la régulation de la mort cellulaire à travers l'existence de sept isoformes de NOX qui diffèrent selon les mécanismes d'activations ainsi que la distribution cellulaire et tissulaire de celles-ci. Ainsi, la dérégulation de l'activité des NOX peut conduire à une grande variété de pathologies.

1. La granulomatose septique chronique

La granulomatose septique chronique (CGD) est une maladie héréditaire orpheline répertoriée comme un syndrome d'immunodéficience héréditaire et caractérisée par la récurrence d'infections bactériennes ou fongiques graves survenant dès le plus jeune âge. Cette pathologie est la conséquence directe du dysfonctionnement de NOX2 dans les cellules phagocytaires [220]. L'absence de ROS causée par la déficience du complexe oxydase ne permet pas l'élimination des pathogènes phagocytés et conduit à la formation de foyers inflammatoires de type granulomateux dans différents tissus constitués de cellules géantes, multinucléées, résultant de la fusion de macrophages ayant séquestré des bactéries non détruites [221].

La forme la plus fréquente et la plus sévère de CGD (CGDX) est liée aux mutations du gène *CYBB* codant NOX2 et porté par le chromosome X. Des formes autosomiques récessives (CGDAR) existent également et concernent les gènes *NCF1*, *NCF2* et *CYBA* codant respectivement pour les protéines p47^{phox}, p67^{phox} et p22^{phox}. Les mutations associées à ces gènes conduisent généralement à l'absence de la protéine correspondante, soit par un défaut de synthèse de l'ARN messager, soit par une instabilité de la protéine mutée (tronquée ou mal conformée) rapidement éliminée (CGDX⁰ ou CGDAR⁰). La forme dite CGDX⁰, la plus classique, se traduit par une absence des deux sous-unités du cytochrome *b*₅₅₈, bien que seul le gène *CYBB* soit atteint. Cette interdépendance des sous-unités NOX2 et p22^{phox} est confirmée dans les CGDAR où une déficience de p22^{phox} entraîne l'absence de NOX2. L'étude des différentes mutations à l'origine de CGDX a permis de mettre en évidence l'existence de trois formes de CGDX caractérisées soit par une absence totale de NOX2 (CGDX⁰), soit par une sous expression de la protéine et donc par une faible activité oxydase (CGDX⁻), soit enfin par une expression normale de NOX2 mais une absence totale d'activité (CGDX⁺). Ces variations présentent un intérêt majeur pour la caractérisation de la NADPH oxydase phagocytaire car elles permettent de déterminer le rôle joué par les domaines et les résidus essentiels de la protéine. Ainsi les mutations à l'origine des CGDX⁺ sont majoritairement impliquées dans le fonctionnement de l'oxydase et influent peu sur la stabilisation de la protéine, tandis que les mutations à l'origine des CGDX⁻ sont primordiales pour la maturation et le repliement correct de NOX2 [222].

2. Maladies du système nerveux central

Le cerveau, en raison de l'importante quantité d'oxygène consommée par celui-ci⁶, de la présence de nombreux lipides sensibles à l'oxydation, et de défenses antioxydantes réduites associées à cet organe, constitue un élément particulièrement exposé aux dérégulations de l'homéostasie redox [223]. Par

⁶ Le cerveau consomme l'équivalent de 20% de la quantité totale d'oxygène présente dans le corps [Yan, 218]

conséquent, une altération des voies de production des espèces réactives de l'oxygène peut entraîner des troubles neurologiques ainsi que des dégâts significatifs sur le cerveau. Les ARNm des NOX1, 2, 3 et 4 ont été identifiés dans différents types cellulaires du système nerveux central tels que les neurones [224], les microglies [225, 226] et les vaisseaux intracrâniens [227] et l'implication des NOX dans les maladies dégénératives a désormais été démontrée par un grand nombre d'études [223, 224].

A. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par la destruction des neurones à dopamine de la substance noire du cerveau, déclenchant des modifications du complexe moteur au niveau du noyau gris central (ganglions de la base) qui se manifestent par des troubles du mouvement [229]. L'étude des mécanismes liés à la maladie de Parkinson repose principalement sur le développement d'un modèle murin reproduisant les symptômes de dégénérescence humaine grâce à l'administration de 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induisant la translocation du facteur p47^{phox} et ainsi l'activation de NOX2 [230]. En effet, après traitement MPTP, la présence de taux élevés de complexe NOX2-p47^{phox} a été observée *in-vivo* [231]. En accord avec ce modèle, la dégénérescence des neurones à dopamine est atténuée au sein des souris NOX2^{-/-} par rapport aux individus sauvages, confirmant que l'activation de NOX2 joue un rôle essentiel dans la perte des neurones à dopamine liée à la maladie de Parkinson [232]. De plus, des travaux d'immunomarquages ont mis en évidence l'origine microgliale des NOX impliquées dans la maladie de Parkinson (Fig.1.4.1). De nombreuses données suggèrent également l'implication des NOX dans les symptômes neurodégénératifs déclenchés par le 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induisant une expression accrue de NOX2 et p47^{phox} conduisant ainsi à une production amplifiée d'anion superoxyde [233].

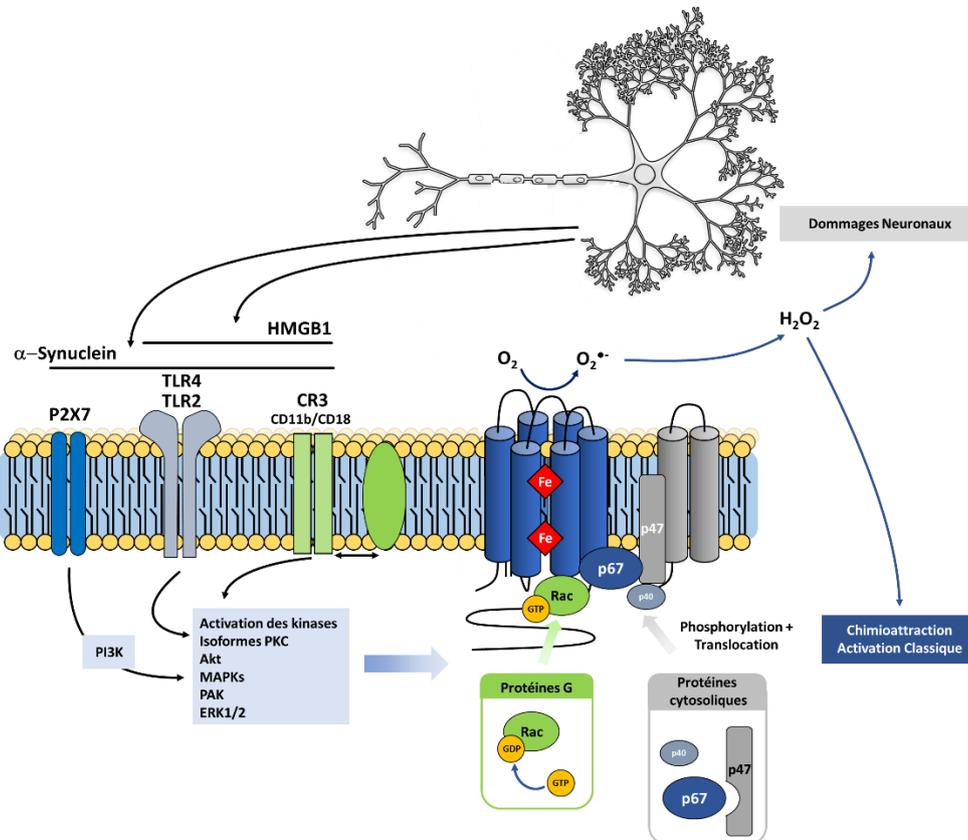


Fig.1.4.1 : Activation de NOX2 d'origine microgliale impliquée dans la maladie de Parkinson. L'activation des microglies par l' α -synucléine peut impliquer différents récepteurs de surface tels que P2X7, TLR2/4 et CR3 et l'activation subséquente de plusieurs kinases incluant les PKCn Akt, MAPK, PAK et ERK1/2 conduisant à la phosphorylation et la translocation de p47^{phox} permettant l'activation de NOX2. La production de ROS aboutit à l'activation de la chimioattractation microgliale et à un stress oxydatif. Les dommages neuronaux activent ensuite le relargage de l' α -synucléine et de la protéine (HMGB1). La figure est reproduite à partir de [228]

Enfin l'intervention des NOX dans la maladie de Parkinson a également été révélée par l'intermédiaire d'autres modèles dégénératifs indépendants. Ainsi, l'inhibition de NOX2 par le DPI (diphénylene iodonium) démontre une diminution significative de la dégénérescence neuronale médiée par le paraquat, un inducteur de la maladie de Parkinson [234].

B. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer résulte d'une dégénérescence progressive des neurones initiée au niveau de l'hippocampe, constituant une structure cérébrale essentielle pour la mémoire, puis étendue au reste du cerveau conduisant alors à une perte significative des fonctions cognitives aboutissant à la démence. L'accumulation de peptides β -amyloïdes ($A\beta$) dans le cerveau constitue un marqueur significatif de la maladie d'Alzheimer [235]. L'implication des NOX dans cette pathologie a notamment été établie avec l'exposition de microglies à des taux élevés de peptides $A\beta$ induisant la translocation des facteurs cytosoliques des NADPH oxydases et une réduction des symptômes de la dégénérescence des souris suite à l'inhibition de NOX2 par Gp91ds-tat [236]. L'oxydation du cholestérol en 24-hydroxycholestérol, favorisée par le déséquilibre de la balance redox et plus particulièrement par des taux élevés d' H_2O_2 , potentialise les effets pro-apoptotiques et pro-nécrotiques de $A\beta$ [237]. De plus, il a été montré que l'expression de NOX2 ainsi que de NOX4 est significativement augmentée au sein du cerveau des souris âgées humanisées $A\beta$ PP/PS1 reproduisant la maladie d'Alzheimer [238]. L'administration d'un traitement antioxydant composé de tert-butylhydroquinone à ces souris inhibe l'expression de NOX2 et prévient ainsi la peroxydation lipidique au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe, indiquant qu'il semble exister une relation linéaire significative entre l'activité des NOX, le taux de production d' $A\beta$ et la dégénérescence neuronale.

Enfin, au cours des étapes initiales de la maladie, un taux d'expression accru des ARNm de NOX1 et NOX3 dans la région CA1 de l'hippocampe à l'origine de la démence neuronale [239], ainsi qu'un taux élevé d'anions superoxydes a également été reporté dans des modèles de démence vasculaire BBcao [240].

L'ensemble de ces résultats démontrent ainsi l'existence d'une corrélation entre l'expression et l'activité des NADPH oxydases du système cognitif et le développement de la maladie d'Alzheimer (Fig1.4.2).

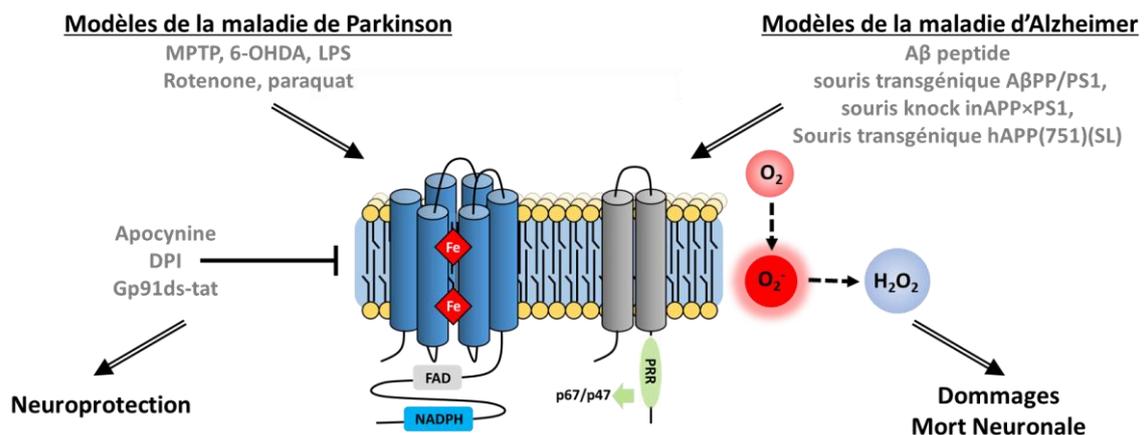


Fig.1.4.2 : Neurodégénérescence et neuroprotections liées à l'activation des NOX. Dans les modèles de maladies de Parkinson et d'Alzheimer, la surproduction de ROS associée à l'activation des protéines de la famille des NADPH oxydases contribue à la neurodégénérescence. L'inhibition des NOX par l'apocynine, le DPI ou la Gp91ds-tat permet la protection des neurones. La figure est reproduite à partir de [229].

3. Cancers

L'importance des NADPH oxydases dans le développement et la progression des cancers a été démontrée avec l'expression particulièrement élevée des isoformes NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5

ainsi que leurs composants cytosoliques respectifs dans de nombreux types de tumeurs humaines et de lignées de cellules cancéreuses cultivées à différents stades de la tumorigenèse [241, 242, 243]. L'expression exogène de NOX1 dans des fibroblastes sauvages NIH3T3 augmente notamment la croissance cellulaire et la capacité de formation de tumeurs dans des souris immunodéficientes. La surexpression de NOX1 selon un facteur 10 conduit à un phénotype similaire malgré une augmentation de la production d' $O_2^{\bullet-}$ limitée, indiquant ainsi qu'un niveau élevé de ROS n'est pas responsable de l'initiation des processus tumoraux. En revanche, la co-expression d'une catalase (CAT) permettant de rétablir le phénotype initial, démontre que l' H_2O_2 constitue le facteur à l'origine de l'induction de ces mécanismes [244, 204]. De plus, une étude portant sur plus de 100 personnes atteintes de cancers gastriques a également montré que les patients présentant un faible pronostic vital (inférieur ou égal à 5 ans) présentaient des taux supérieurs de NOX2 au niveau des tumeurs par rapport aux tissus adjacents [245].

Un rôle potentiel du peroxyde d'hydrogène produit par les NOX dans la défense antitumorale a également été suggéré suite aux observations, après traitement à la doxorubicine ou la camptothécine⁷, de l'apoptose des cellules cancéreuses dépendante de l' H_2O_2 [246, 247, 248].

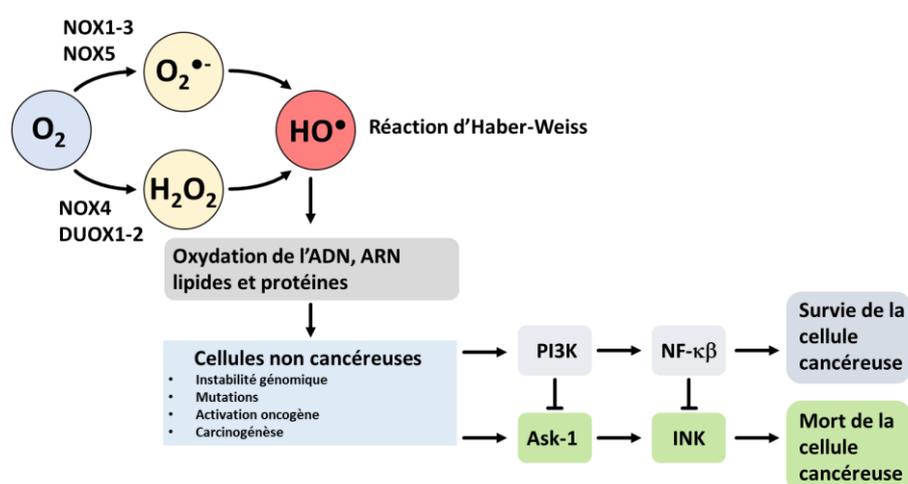


Fig.1.4.3 : Sources endogènes de ROS et conséquences liées à leur surproduction. La surproduction d'anions superoxydes et d' H_2O_2 par les NOX/DUOX et l'augmentation associée du taux de radical hydroxyle à travers les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss conduisent à l'oxydation des lipides, protéines et ADN et en conséquence à une instabilité génomique, un risque élevé de mutation et de carcinogénèse. Dans ces conditions, la survie ou la mort cellulaire dépendent respectivement de l'activation des voies de signalisation PI3K ou Ask-1. Des taux élevés de ROS favorisent la voie Ask-1/JNK conduisant à la mort cellulaire, tandis que des taux plus faibles ou transitoires de ROS peuvent activer les kinases PI3K, accompagnés par une inhibition de Ask-1/JNK et ainsi assurer la survie cellulaire médiée par NF- κ b [243]

A. Développement des tumeurs

Dans un contexte de stress oxydatif, les ROS produits pas les NOX peuvent induire une instabilité génomique conduisant au développement de cancer par l'intermédiaire de signaux de communication cellulaire, de dommages de l'ADN, ou encore d'altérations de différentes fonctions protéiques. Cependant, le rôle exact des NOX dans la transformation cellulaire n'est pas clairement identifié à ce jour.

Les ROS issus de NOX4 sont impliqués dans le dysfonctionnement mitochondrial et les dommages de l'ADN mitochondrial [249, 250, 251], mais pourraient également être responsables de l'oxydation directe des protéines nucléaires et de l'ADN, en raison de la localisation de NOX4 au sein du noyau [252].

Outre leur rôle dans l'instabilité génomique, les homologues NOX1 et NOX2 exercent également des fonctions de régulation de l'activité de p53, un facteur de transcription inhibiteur du cycle cellulaire,

⁷ La doxorubicine ou la camptothécine constituent des traitements anti-cancéreux classiques utilisés dans la chimiothérapie.

dont la fonction du gène associé, inactivé dans 50% des cancers humains, a été attribuée depuis 1989 à la suppression de tumeurs. Le corépresseur HIPK2, contrôle indirectement p53 en activant l'expression de NOX1, dont l'activation inhibe la désacétylation et l'inactivation de p53 par la protéine de stress Sirtuin1 (SIRT1) [253]. L'induction de l'expression de NOX1 s'accompagne également d'une augmentation des mutations de K-RAS, un proto-oncogène impliqué dans 30% des tumeurs humaines.

B. Prolifération, invasion et métastases

Les cellules cancéreuses peuvent migrer et se propager dans différentes régions d'un même organe ou sur des sites distants. Cette prolifération constitue la phase métastatique et se déroule en plusieurs étapes incluant l'invasion de la matrice cellulaire par les cellules tumorales, puis la migration progressive à travers l'endothélium pour atteindre les vaisseaux (intravasation/extravasation) et ainsi aboutir à la colonisation, participant alors à la formation d'un foyer tumoral secondaire [254, 255]. Les étapes de dégradation de la matrice extracellulaire et de l'extravasation sont médiées par les invadopodes, des structures riches en actine contenant principalement des intégrines, des métalloprotéases ainsi que certains homologues de NOX, dont la formation est dépendante des ROS produits par les NOX [256, 257, 258]. Deux protéines exclusives aux invadopodes, Tks4 et Tks5, présentent une homologie avec p47^{phox} et sont capables de s'associer à NOX1 et NOX3, conduisant ainsi à l'activation de ces isoformes, indépendamment de la présence des protéines organisatrices [259, 260]. La formation des invadopodes médiée par les ROS pourrait donc se révéler dépendante de la formation de ce complexe protéique NOX-Tks unique dont la présence est exclusive aux membranes de ces structures [256, 261].

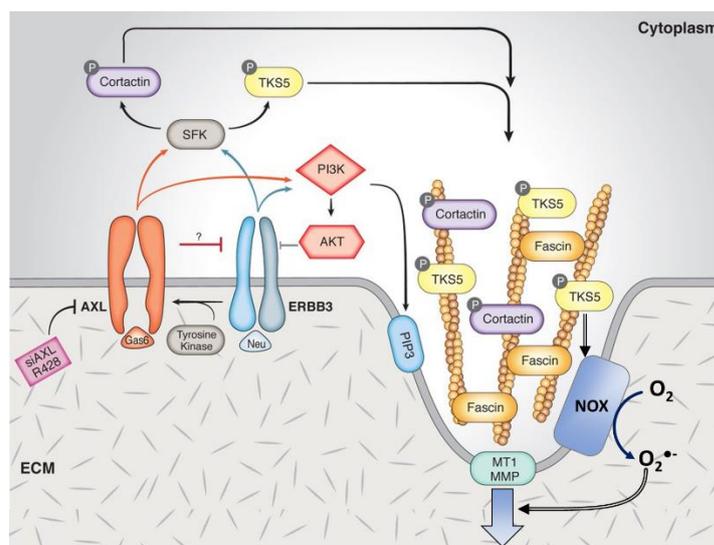


Fig.1.4.4 : Modèle de régulation des invadopodes par l'association de la protéine Tks5 avec la NADPH oxydase. Modèle initial proposé par [262] et adapté pour inclure l'activation de la formation de l'invadopode, principalement composé d'actine, médié par les ROS produits suite à la formation du complexe Tks5-NOX au sein des structures

De plus, les ROS dérivés de NOX1 se sont révélés cruciaux pour la régulation de la phase métastatique par l'intermédiaire des Toll-like récepteurs 4 (TLR4) dans les cellules cancéreuses des poumons [263]. Il a été suggéré que l'activité de NOX1 médiée par TLR-4 accélère l'adhérence des cellules cancéreuses stimulée par les LPS dans le colon à travers un mécanisme au cours duquel l'activation de NF- κ B dépendante de TLR-4 conduit à une stimulation de l'activité de NOX aboutissant ainsi à des taux plus élevés de ROS ainsi qu'à la phosphorylation d'Akt impliquée dans la voie de communication PI3K/Akt responsable de la stimulation du potentiel d'invasion des carcinomes urothéliaux [264].

C. Angiogenèse induite par les tumeurs

La capacité des cellules cancéreuses à se propager aux tissus voisins ou distants est largement dépendante de l'oxygène et des nutriments délivrés par le système vasculaire [265]. L'angiogenèse est ainsi une étape indispensable au développement des tumeurs de plus de 2mm de diamètre car elle permet l'apport direct de nutriments aux amas de cellules cancéreuses (tumeurs solides). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est notamment régulée par la cascade de signalisation HIF-1 α /VEGF/MMP activée par les ROS [266, 267] ainsi que par l'hypoxie, favorisant alors la formation de tumeurs. Ce processus a été décrypté par la compréhension des mécanismes de dégradation de HIF-1 α dans des conditions normales d'oxygène, et a été récompensé du prix Nobel de médecine 2019. Les isoformes NOX1, 2, 4 et 5 (Fig.1.4.5), localisées dans les cellules endothéliales et impliquées dans toutes les étapes de l'angiogenèse (Partie I.3.B) occupent donc un rôle essentiel dans ce processus lorsqu'il est induit par les cellules cancéreuses.

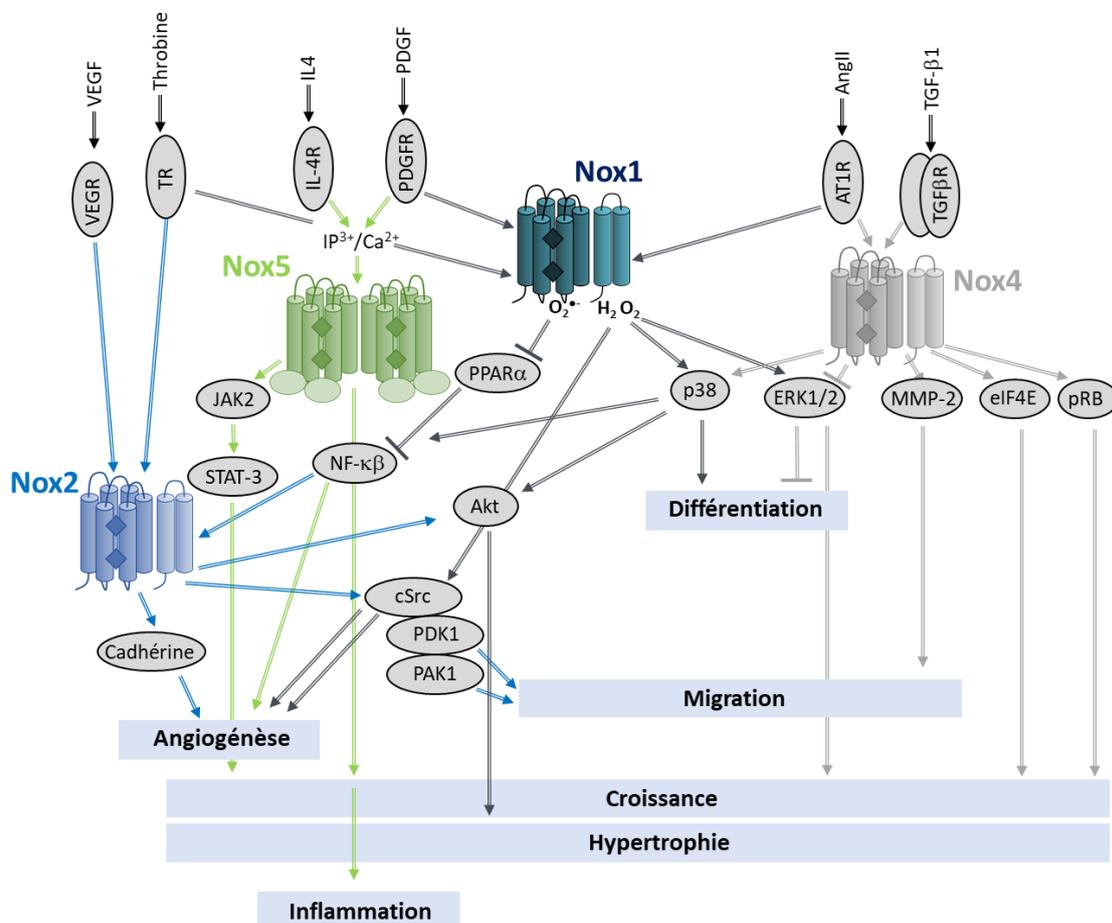


Fig.1.4.5 : Exemples de voies de signalisation régulant les différentes étapes cancéreuses et impliquant les NOX1, 2, 4 et 5. Les ROS dérivés de NOX1, activée par la thrombine, le PDGF ou l'Ang II, peuvent affecter la différenciation par les voies p38 et ERK1/2, l'hypertrophie via l'activation d'Akt médiée par p38, la migration cellulaire par l'activation de cSrc (Proto-oncogène tyrosine-protéine kinase Src) et la croissance cellulaire par l'activation d'ERK1/2, l'activation ultérieure du facteur de transcription Ets-1 et la régulation à la hausse de la cycline D. NOX1 régule également négativement l'expression et l'activité du récepteur antiangiogénique PPAR α , connu pour inhiber le facteur de transcription NF- κ B et, par conséquent, l'angiogénèse. NOX2, activée par le TNF α , la thrombine ou le ROS généré par NF- κ B favorisent la migration et l'angiogénèse par les voies Akt et cSrc. La régulation de l'angiogénèse par l'intermédiaire de NOX2 se produit également via la cadhérine, l'activation de p38 ou la régulation de l'activation de ERK1/2 médié par les ROS issus de NOX4. NOX2 régule également la croissance par l'activation de p38 ou l'inhibition de la différenciation ERK1/2, et la migration par les voies eIF4E (Eukaryotic initiation factor 4E) et pRB. L'expression et l'activité de NOX4 sont activées par TGF- β 1 ou Ang II. NOX5, dont la production de ROS est activée par IL4 ou PDGF, favorise la croissance et l'inflammation, respectivement, par les voies de signalisation JAK-2 / STAT3 et NF- κ B.

Ainsi, dans les cancers ovariens, les ROS produits par NOX4 sont indispensables à l'angiogenèse induite par la tumeur ainsi qu'à la régulation du taux de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) par l'intermédiaire de l'expression de HIF-1 α [268, 269]. De plus, les ROS dérivés de NOX1 et NOX4 stimulent également la vascularisation médiée ou non par HIF-1 α dans les cancers de la prostate et des mélanomes malins [268, 270].

4. Maladies Cardiovasculaires

La production de ROS au niveau des vaisseaux sanguins est essentielle afin de rediriger le flux sanguin vers les tissus les plus actifs et ainsi maintenir l'homéostasie vasculaire. Cependant, les ROS participent également au développement de maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'athérosclérose, les diabètes, l'hypertrophie ainsi que l'arrêt cardiaque. En effet, de multiples enzymes, dont les NADPH oxydases, les oxyde nitrique synthases (NOS), les protéines du complexe respiratoire et les cytochromes P450, réparties et exprimées de façon diverses au niveau du système vasculaire, sont responsables de la production de ROS. Alors que ces systèmes sont tous impliqués dans les différents états pathologiques, les NOX semblent exercer un rôle central en orchestrant la stimulation ou le dysfonctionnement des autres enzymes [271]. De plus, la production de ROS médiée par les NOX déclenche également la libération de ROS par les autres sources.

Les différents homologues de la famille des NOX sont exprimés de manière variable dans les parois vasculaires incluant les cellules endothéliales, les cellules musculaires souples, les fibroblastes et les cellules immunitaires infiltrantes. Le profil d'expression des NOX varie non seulement selon les pathologies mais également en fonction du stade d'avancement associé à celle-ci. En condition physiologique, les NOX vasculaires présentent une activité basale faible. Cependant, la dérégulation ou la production chronique de ROS en quantité élevées, stimulées par les cytokines, les facteurs de croissance ou un niveau élevé de glucose, brisent l'homéostasie vasculaire et contribuent ainsi au développement de ce type de pathologies.

A. Hypertension

L'hypertension est une pathologie multifactorielle faisant intervenir une résistance vasculaire accrue, une augmentation du débit cardiaque, une atténuation de l'excrétion du sodium rénal ainsi qu'un dysfonctionnement de la régulation de la pression artérielle. Elle constitue la première pathologie dans lesquelles les NOX vasculaires ont été clairement impliquées (Fig.1.4.6) [272].

L'angiotensine 2 exerce un rôle majeur dans le développement de l'hypertension et constitue l'un des inducteurs les plus importants dans la production de ROS médiée par les NOX dans le système vasculaire. Ce facteur active notamment par l'intermédiaire des récepteurs à l'angiotensine de type 1 (AT1) [273], l'expression des homologues NOX1, 2 et 4 et du facteur cytosoliques p22^{phox} qui participent à différents degrés à l'hypertension et au dysfonctionnement vasculaire associé [272]. Après plusieurs années, les souris hypertensives (SHR) présentent une surexpression de NOX1 au niveau de l'aorte. Cette surexpression induite par Ang2 provoque une augmentation significative de la pression sanguine systolique accompagnée d'hypertrophie, tandis que la délétion de NOX1 protège les souris des dysfonctionnement et complications vasculaires [274]. De manière similaire, la surexpression des gènes de NOX2, au sein des souris modèles SHR conduit à un phénotype hypertensif [271]. En revanche, l'inactivation de p47^{phox}, conduisant à une activation déficiente de NOX1 et NOX2, entraîne chez les souris une hypertension réduite ainsi que des fonctions endothéliales préservées après une exposition chronique à Ang2 [275, 276].

Alors que les approches sur NOX1 et NOX2 ont permis de définir le rôle de ces homologues dans l'hypertension, l'intervention de NOX4 semble plutôt exercer une fonction protectrice [277]. En effet, la surexpression de NOX4 stimule la vasodilatation et conduit à la réduction de la pression sanguine basale, suggérant ainsi un rôle protecteur de NOX4 lié à la production accrue d'H₂O₂ [278]. Dans les

conditions de stress induites par Ang2, la perte de NOX4 aboutit à une réduction de l'expression de l'hème oxygenase-1 (HO-1), de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) et donc de la production de monoxyde d'azote, conséquences associées à l'activation de l'apoptose et de l'inflammation dans les souris *Nox4^{-/-}* [279] Il apparaît ainsi clairement que NOX4, contrairement à NOX1 et NOX2, induit une protection du système vasculaire lors des stress ischémique ou hypertensif.

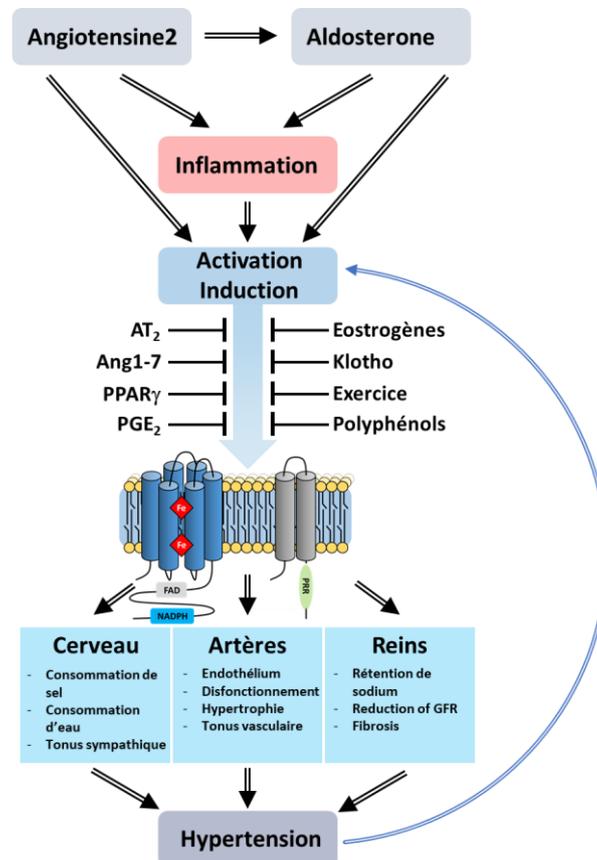


Fig.1.4.6 : Rôle de la NADPH oxydase dans l'hypertension. L'angiotensine II conduit à l'activation et l'expression des NADPH oxydases par l'intermédiaire du récepteur AT₂, de l'aldostérone, de l'inflammation et de l'augmentation du tonus vasculaire. Différents facteurs incluant la prostaglandine E₂ (PGE₂), l'exercice, les œstrogènes, et l'angiotensine, via le récepteur AT₂ limite ce processus. Les NADPH oxydases présentes au sein du cerveau, des artères et des reins contribuent au développement de l'hypertension à travers différents mécanismes. Dans les reins par exemple, l'activation des NADPH oxydases semble déstabiliser la boucle de rétroaction tubulo-glomérulaire ainsi que le taux de filtration glomérulaire (GFR) [280].

B. Athérosclérose

L'athérosclérose se caractérise par le dépôt de plaques majoritairement composées de lipides sur la paroi des artères. Ces plaques peuvent conduire à la lésion de la paroi artérielle ou à l'obstruction du vaisseau. Un grand nombre de travaux ont sondé le rôle des NADPH oxydases dans l'athérosclérose à l'aide de modèles animaux. Il a ainsi été montré que les cellules vasculaires présentant des plaques d'athéromes manifestent des taux d'expression de NOX2, 4 et 5 supérieurs aux cellules saines [281, 282]. En présence de lipides de faible densité (LDL), la production d'anions superoxydes par les NOX stimule l'endocytose des lipides, favorisant ainsi la formation des plaques (Fig.1.4.7). Durant le transfert des LDL à travers les EC, l'exposition des lipides aux taux élevés d'anions superoxydes produits par les NOX conduit à l'oxydation de ceux-ci du côté luminal des EC [283]. Les lipides oxydés sont alors pris en charge par les macrophages recrutés suite à l'augmentation du nombre de cellules d'adhésion, aboutissant alors à la production de cellules spumeuses habituellement observées lors des étapes d'initiation de l'athérosclérose. L'augmentation du niveau d'O₂ provoque également la translocation

du facteur de transcription NF- κ b vers le noyau ainsi que la régulation positive d'un grand nombre de gènes tels que ICAM et ELAM-1 associés aux étapes initiales de l'athérosclérose [284].

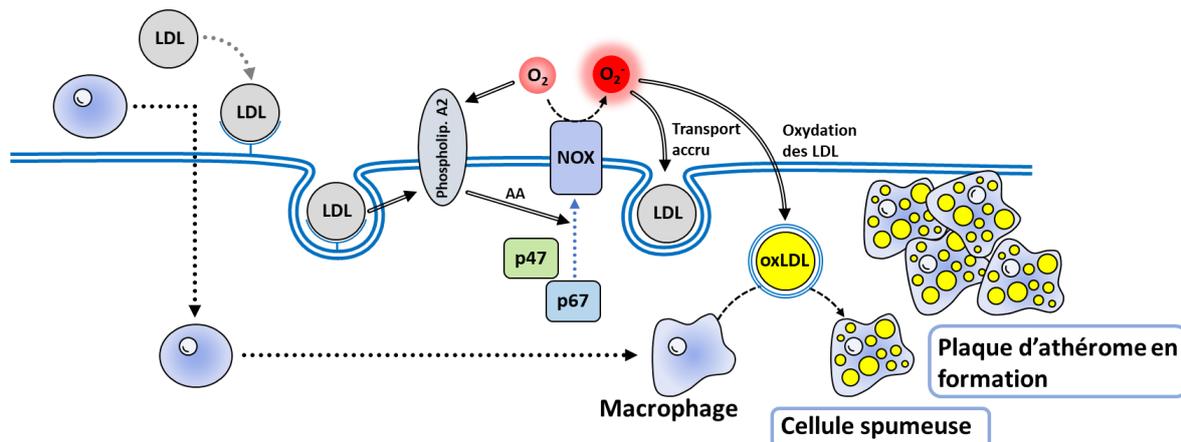


Fig.1.4.7 : Modèle du rôle central de la NADPH oxydase dans la génération d'EC athérogènes. Les niveaux athérogènes de LDL activent la libération d'acide ascorbique (AA) intracellulaire par l'intermédiaire de la phospholipase A2 conduisant à la migration des sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase ($p47^{phox}$ et $p67^{phox}$) vers la NOX enchâssée dans la membrane. La production subséquente d' $O_2^{\bullet-}$ par la NADPH oxydase conduit à l'augmentation du transfert des LDL à travers les EC durant lequel l'exposition des LDL à des niveaux élevés d' $O_2^{\bullet-}$ peut être à l'origine de l'oxydation des LDL (ox-LDL) du côté abluminal de l'EC. L'ox-LDL ainsi générée est absorbée par les macrophages attirés par le nombre croissant de molécules d'adhésion cellulaire, ce qui explique la production de cellules spumeuses observées dans les premières étapes de l'athérosclérose [284].

C. Diabète

Le diabète est associé à une large gamme de dégénérescences métaboliques telles que la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie. En revanche, la majorité des décès chez les patients diabétiques résultent de complications cardiovasculaires. Chez les personnes atteintes de diabète [285], de même que pour les animaux modèles [286], les ROS produits lors de l'hyperglycémie sont impliqués dans le dysfonctionnement endothélial et favorisent alors la progression des pathologies vasculaires liées au diabète. Des taux élevés de NOX2 et NOX4 ont été reportés dans les aortes des souris modèles d'athérosclérose ApoE^{-/-} exposées à la streptozotocine, un inducteur de diabète [287]. De plus, il a été constaté que NOX1 et NOX4 étaient surexprimées chez des souris diabétiques db/db, indiquant ainsi que les homologues NOX1 et NOX4 exécutent un rôle potentiel dans les maladies macrovasculaires liées au diabète [288]. La délétion de NOX1 chez les souris diabétiques, de même que le traitement de ces animaux avec GKT137831, un inhibiteur de NOX1, entraîne une réduction considérable des plaques athérosclérotiques [289]. Cependant, l'absence de NOX4 n'a pas entraîné de modifications des conditions vasculaires des souris diabétiques suggérant ainsi que cette isoforme n'exerce pas un rôle direct dans les vasculopathies diabétiques, mais pourrait avoir des effets indirects à travers la régulation de l'adipogenèse⁸ [290] par l'intermédiaire de la voie de signalisation MAPK ERK1/2. Des taux élevés de NOX4 ont en effet été reportés dans les pré-adipocytes, au sein desquels la suppression du gène de NOX4 bloque notamment la différenciation des cellules souches en adipocytes.

L'hyperglycémie est également capable d'activer les NADPH oxydases vasculaires. En effet l'incubation de cellules endothéliales avec des globules rouges de patients atteint d'un diabète de type 1 a conduit à une activation des NADPH oxydases endothéliales contrairement à l'exposition avec des cellules saines [291]. Cette activation conduit à des quantités élevées de ROS comme indiqué par l'augmentation de la production d'anions superoxydes détectée dans les artères et les veines des patients diabétiques.

⁸ L'adipogenèse constitue la différenciation des pré-adipocytes et adipocytes médiée par l'insuline.

5. Conclusion

Les NOX se révèlent essentielles à de nombreux processus physiologiques, et leur dérégulation peut induire de multiples pathologies. Les protéines de la famille des NADPH oxydases constituent ainsi des cibles thérapeutiques dont l'étude est fondamentale afin de proposer des solutions thérapeutiques permettant de remédier aux complications liées aux maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou tumorales. Le développement de molécules adaptées permettant le traitement de ces conditions nécessite en effet la compréhension préalable des processus de régulation des mécanismes d'activation des NOX grâce à l'étude fonctionnelle et structurale de ces enzymes.

Les protéines se replient dans l'espace pour adopter une structure tridimensionnelle native unique dictée par leur séquence en acides aminés et conférant à celles-ci leurs propriétés biologiques, et leur permettant ainsi d'exercer leur fonction.

L'acquisition de données structurales des protéines permet ainsi de révéler les détails des interactions atomiques au niveau de domaines d'interaction ou encore du site catalytique et apportent des informations essentielles à la compréhension approfondie de mécanismes associés à la fonction de la protéine. Ainsi, en permettant de décrypter des informations intrinsèques au repliement spécifique de la protéine, l'étude structurale peut fournir un socle permettant d'aboutir à des avancées dans la compréhension globale d'événements mécanistiques au sein du site catalytique afin de d'adapter la conception de molécules spécifiques permettant de moduler l'activité de la protéine étudiée.

Ainsi la connaissance de la structure des NOX est essentielle pour la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert électronique, et permettrait également d'accomplir des progrès substantiels vers le développement d'inhibiteurs thérapeutiques [109].

1. Données structurales d'homologie avec les FNR

En 1993, un premier modèle tridimensionnel du domaine déshydrogénase de NOX2 (Fig.1.5.1.a) avait été élaboré par homologie avec les enzymes de la superfamille des Ferrédoxine-NADP⁺ Réductases (FNR) [292]. La comparaison du modèle de DH de NOX2 a permis l'identification d'une insertion d'une séquence de 21 acides aminés additionnels (NIS) (D484-G504) au sein du motif de liaison au NADPH, dont la position semble stratégique pour permettre la régulation de l'accès du substrat NADPH à son site de liaison au sein de l'enzyme. Cette observation est en accord avec l'existence d'un mécanisme d'activation des NOX, en opposition au caractère constitutif des protéines de type FNR.

En 2009, la résolution par cristallographie aux rayons X de la structure du domaine de liaison au NADPH de NOX2 (PDB : 3A1F) a conduit à la réalisation d'un nouveau modèle contraint à l'aide des données structurales du fragment obtenu (Fig.1.5.1.b), aboutissant à des améliorations significatives du modèle du domaine déshydrogénase de NOX2, notamment au niveau du positionnement et de l'exposition au solvant d'une région potentiellement régulatrice de l'activité de NOX2 [139]. Au sein de ce second modèle, l'hélice de la région NIS présente une haute flexibilité en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'interaction des facteurs cytosoliques avec la NIS pourrait engendrer des changements conformationnels et modifier l'état d'activation de NOX2.

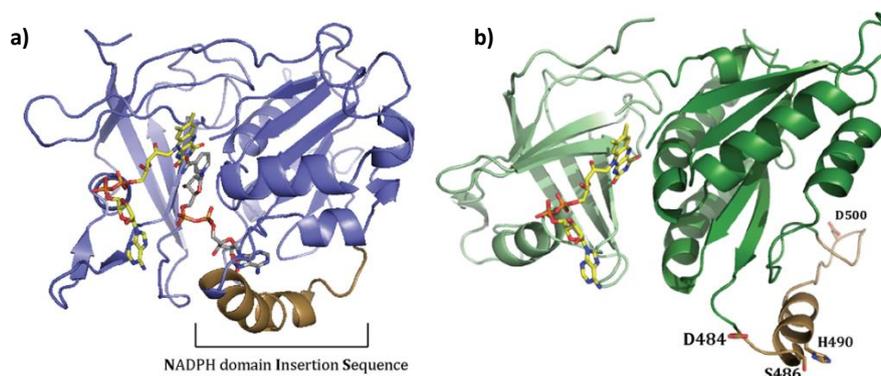


Fig.1.5.1 : Modèles d'homologies tridimensionnels du domaine déshydrogénase de NOX2. (a) Modèle de Taylor et al. (1993) [292]. (b) Modèle de Beaumel et al. (2017) [139].

En revanche, la difficulté d'obtenir une NADPH oxydase pure, dont le repliement natif est préservé et fonctionnel, en quantité suffisante pour les études structurales et mécanistiques, a largement contribué à complexifier et limiter la réalisation d'avancées significatives au sujet des NOX.

Malgré les efforts importants déployés pour développer la culture de cellules de mammifères [293] et améliorer les stratégies de purification [294], les quantités de NOX2 produites se sont toujours avérées insuffisantes pour les études structurales. De plus, les tentatives d'expression de NOX2 dans *E. coli* ou en système acellulaire ont conduit à la production d'une forme C-terminale tronquée [295, 296, 297, 125].

En effet, en raison de leur caractère membranaire, ces enzymes nécessitent d'être extraites des membranes conduisant généralement à une protéolyse spontanée de la protéine ou à la perte des cofacteurs liés de façon non covalente (hèmes et FAD).

Ainsi la surexpression et la production des NOX eucaryotes constitue donc une étape limitante, dont le rendement final de protéine obtenue est généralement très faible [298]. D'autre part, la difficulté de ce processus est encore amplifiée par le fait que la reconstitution du flavocytochrome *b*₅₅₈ fonctionnel nécessite la production simultanée en condition stœchiométriques des 2 sous-unités membranaires.

Enfin, les études structurales des NOX sont également complexifiées par la présence de larges zone hydrophobes présentes dans le domaine transmembranaire ainsi que par la flexibilité du domaine déshydrogénase de la protéine [299].

2. Données structurales expérimentales

Ainsi, jusqu'à récemment, malgré les efforts réalisés au cours de ces vingt dernières années, aucune structure du composant catalytique membranaire des NADPH oxydases n'avait pu être résolue et parmi les 21 structures alors disponibles dans la base de données PDB (Protein Data Bank), seule deux entrées concernant un sous-domaine de la sous-unité catalytique étaient accessibles (Fig.1.5.2).

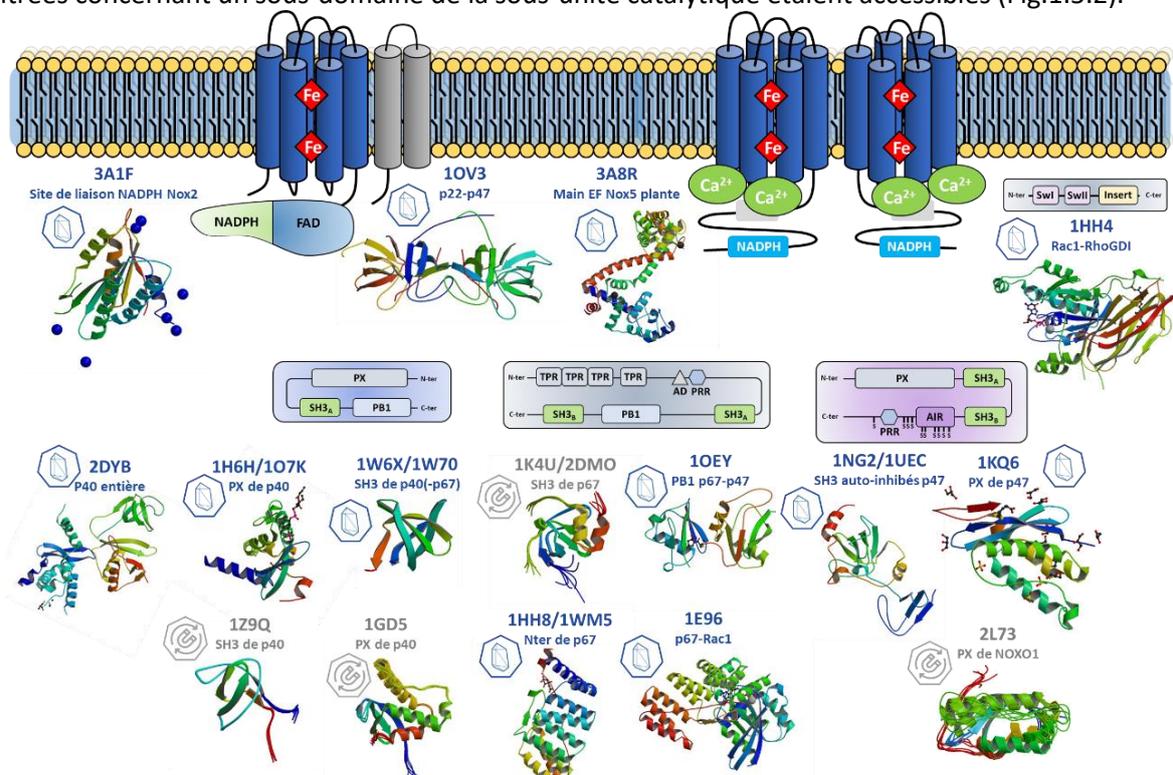


Fig.1.5.2 : Représentation des structures relatives au NOX humaines disponibles sur la banque de données PDB. Les structures sont représentées avec leur référence PDB, groupées en fonction du composant protéique auxquelles elles font référence. Les références PDB séparés par des / concernent des structures de la même région du même composant protéique. Les codes PDB bleus indiquent les structures résolues par diffraction des rayons X et les gris indiquent les structures résolues par RMN.

A. Structures des facteurs cytosoliques

La liste des structures apparentées aux NOX répertoriées dans la PDB met en évidence la prédominance des partenaires cytosoliques solubles des NOX au sein des données structurales disponibles (48%), principalement sous forme fragmentaire, avec seulement 2 structures (9.52%) correspondant à des sous-unités cytosoliques entières, respectivement p40^{phox} (2DYB) et le complexe constitué par RhoGDI (Rho GDP-dissociation inhibitor) associé la protéine Rac sous forme entière (1HH4) [300].

Lors de l'activation du complexe NADPH oxydase, la protéine partenaire p40^{phox} recrute, dans le phagosome, la protéine activatrice p67^{phox} par l'intermédiaire de la liaison intermoléculaire de leurs domaines PB1 respectifs. Au cours de ce processus, le domaine PX de p40^{phox} s'associe également avec les lipides membranaires de signalisation PIP₃. La résolution de la structure cristallographique de p40^{phox} montre que le site de liaison pour le PIP₃ est masqué en raison de l'existence au repos d'une interaction intramoléculaire des domaines PX et PB1 de p40^{phox} (Fig.1.5.3.a,b) [301]. De manière similaire à p47^{phox}, la phosphorylation de p40^{phox} pourrait induire un changement conformationnel permettant de dévoiler les motifs du facteur cytosolique. De plus, l'analyse de la surface d'interaction de p40^{phox} révèle que la liaison entre les motifs PB1 et PX de p40^{phox} est localisée à l'opposé du domaine de liaison à p67^{phox} *via* les domaines PB1 respectifs de p40^{phox} et p67^{phox}. L'auto-inhibition de p40^{phox} à travers l'interaction PX-PB1 n'empêche donc pas l'association PB1-PB1 avec p67^{phox} [139].

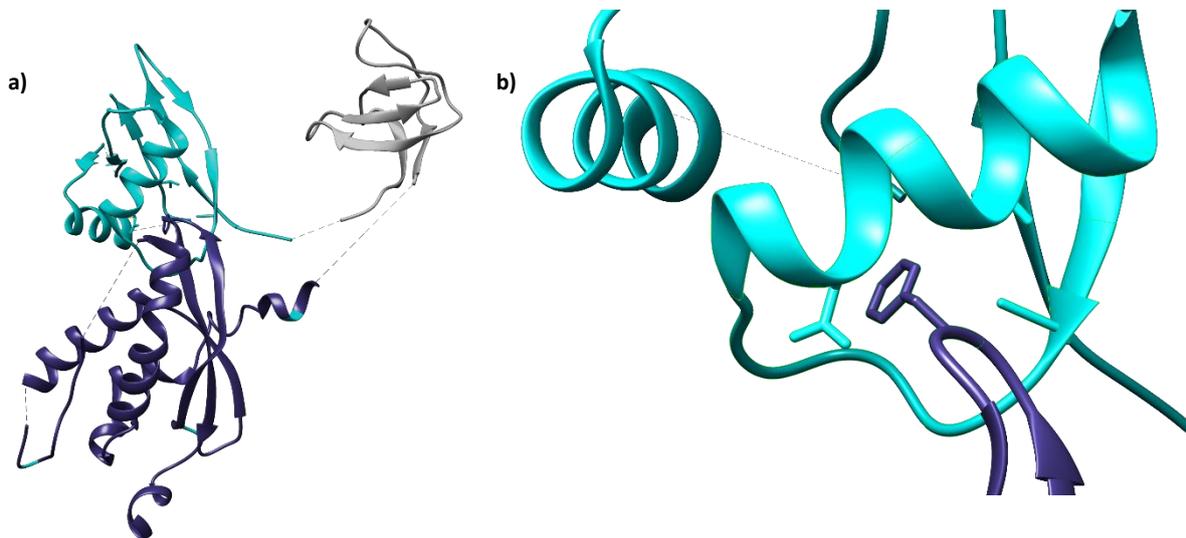


Fig.1.5.3 : Structure résolue de p40 (2DYB) par cristallographie aux rayons X à 3.15Å. (a) Structure de p40^{phox} complète, domaine PB1 (cyan), domaine PX (bleu), domaine SH3 (gris). (b) détail sur l'interaction entre le domaine PX (bleu) et le domaine PB1 (cyan). Reproduit depuis [301]

La structure de la petite GTPase Rac1 a été résolue au sein du complexe Rac1-RhoGDI, dans lequel Rac est lié au GDP [124]. Au sein de ce complexe, les régions switch I et switch II de Rac1, impliquées dans la liaison au nucléotide, adoptent respectivement une conformation permettant la liaison au GDP (switch I) ou une conformation proche d'une GTPase liant le GTP (switch II). De plus, cette structure met en évidence deux types d'interactions entre Rac1 et RhoGDI. L'interaction lipide-protéine de la queue C-ter géranyl-géranyl de Rac1 avec RhoGDI, empêchant la localisation de Rac1 à la membrane, s'accompagne de nombreuses modifications structurales au cœur de RhoGDI. La liaison de Rac1 avec RhoGDI est également assurée par des liaisons hydrogènes impliquant les résidus Tyr64_{Rac}, Arg66_{Rac}, His103_{Rac} et His104_{Rac} conservés dans la famille des protéines Rho et localisés dans la région switch II. Enfin des interactions hydrophobes impliquant les résidus Leu67_{Rac} et Leu70_{Rac} contribue à la stabilité du complexe Rac1-RhoGDI.

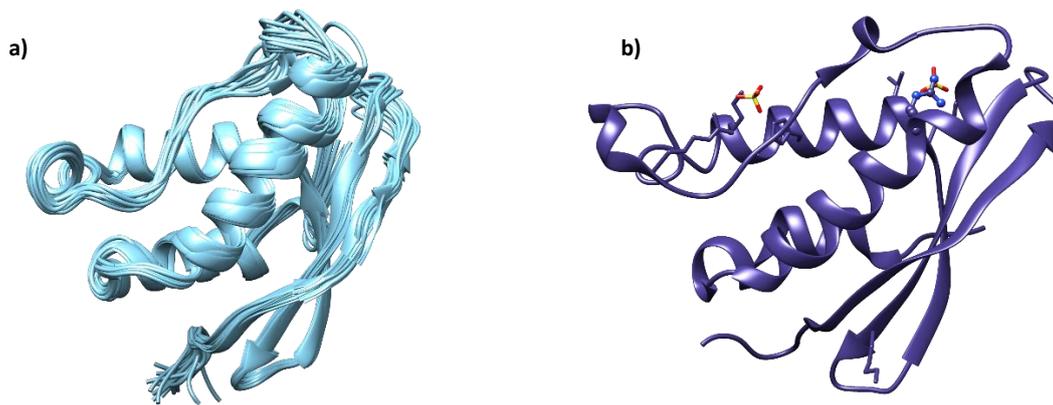


Fig.1.5.4 : Structure du domaine PX de p47^{phox}. Structure du domaine PX résolue (a) par RMN [302] et (b) par cristallographie [303]. PDB access number : 1GD5 et 1O7K.

La structure du domaine PX (1GD5) de p47^{phox}, déterminée en 2000 par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) [302], et également résolue pour l'homologue NOXO1b (2L73 – non publiée), a permis la découverte d'une structure $\alpha+\beta$ dotée d'un motif de repliement inédit (Fig.1.5.4.a). Ces travaux ont également permis la localisation de la région riche en proline (PRR) située sur la surface moléculaire, facilitant ainsi sa reconnaissance par le domaine SH3 [302]. La structure cristallographique de la protéine p47^{phox} dans la conformation auto-inhibée a démontré l'existence d'une coopération entre les deux domaines SH3 de la protéine permettant de maintenir le facteur inactif. Cette interaction peut être déstabilisée suite à la phosphorylation de p47^{phox} lors de son activation permettant l'interaction du tandem SH3 avec le domaine C-ter de p22 à la membrane.

Le domaine PX, dont la structure a également été résolue par cristallographie aux rayons X, présente un repliement similaire avec celui décrit par la structure RMN (Fig.1.5.4.b) [303].

De plus la résolution des structures cristallographiques du PRR de p47^{phox} complexé avec les modules SH3 de p67^{phox} et p40^{phox} a permis de démontrer que le facteur organisateur p47^{phox} présente une affinité supérieure pour p67^{phox} que pour p40^{phox} et notamment pour le domaine SH3B (par rapport au SH3A) de p67^{phox} doté d'une surface électrostatique favorisant la stabilisation de l'arginine R368 du PRR de p47^{phox} [304]

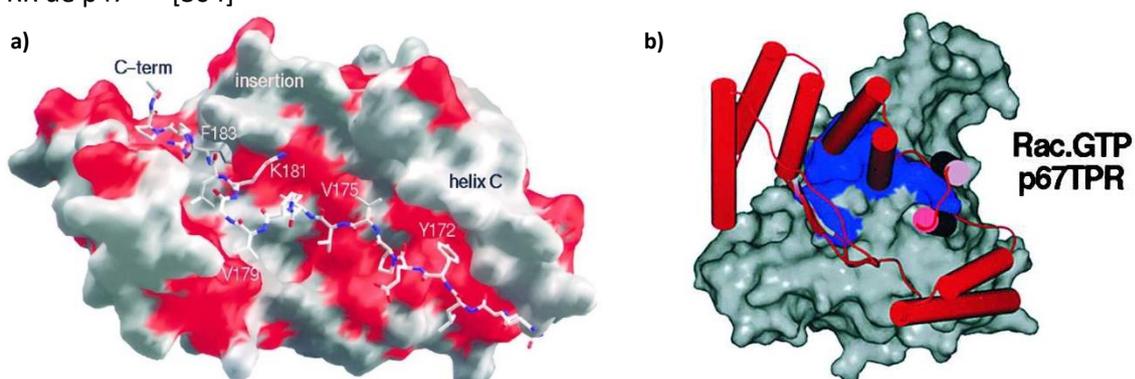


Fig.1.5.5 : Mise en évidence des interactions respectivement intramoléculaire, entre la région multi TPR de p67^{phox} et l'extrémité C-ter de la protéine, ou intermoléculaire entre p67^{phox} et Rac. (a) Les résidus 1 à 167 des TPR de p67^{phox} sont représentés en surface avec les résidus hydrophobes projetés en rouge sur la surface, tandis que les résidus 168–186, qui tapissent l'intérieur du sillon, sont représentés en bâton (b) Représentation en surface de la petite GTPases Rac avec les résidus (bleus) impliqués dans la formation de complexes avec p67^{phox}-TPR (représentation cartoon) [305].

La région N-ter (résidus 1-203) du facteur activateur p67^{phox} (1WM5 – non publiée) a été résolue par diffraction des rayons X. L'extrémité N-ter de p67^{phox} (1-167) constituée de quatre motifs TPR au sein desquels est inséré un plateau β entre les TPR 3 et 4 constituant une plateforme d'interaction avec Rac (Fig.1.5.5.b), se replie pour former un sillon hydrophobe permettant d'accueillir la région immédiatement en C-ter du domaine TPR (168-203) (Fig.1.5.5a) [305]. Cette structure met également

en évidence la présence d'une courte hélice α au niveau C-ter à proximité du site d'interaction de Rac, et semble notamment être impliqué dans l'activation de NOX2 [124].

B. Structure du partenaire p22^{phox}

L'étude de la région d'interaction avec p47^{phox} du partenaire transmembranaire p22^{phox} (aa. 149-168) par cristallographie aux rayons X (1OV3) a permis d'identifier une région riche en proline essentielle pour la liaison avec les domaines SH3 de p47^{phox} [118].

Cette partie centrale du peptide de p22^{phox} forme une hélice polyproline de type II (P55-P60) coincée entre les domaines SH3 N-ter et C-ter de p47^{phox} (Fig.1.5.6), tandis que la région C-ter du peptide adopte une conformation en hélice α courte (A161-R164) constituant un site de liaison additionnel au domaine SH3 N-ter permettant l'amélioration selon un facteur 10 de l'affinité de p47^{phox} pour p22^{phox}.

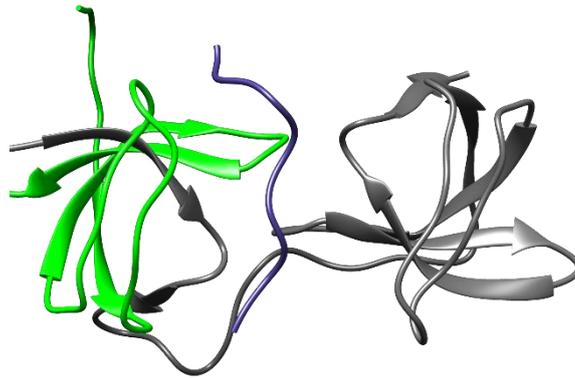


Fig.1.5.6 : Interaction entre la région C-ter de p22^{phox} et le tandem SH3s de p47^{phox}. Structures du tandem SH3 de p47^{phox} (chacun des domaine SH3 est représenté respectivement en vert et en gris) interagissant avec les résidus 149-168 de la partie C-terminale de p22^{phox} (bleu), résolues par diffraction de rayons X [117].

C. Structures du cœur catalytique transmembranaire

Seules deux structures incomplètes du cœur catalytique transmembranaires des NADPH oxydases avaient pu être résolues au début du projet de thèse (2016) et n'incluaient alors qu'un court fragment du domaine déshydrogénase des enzymes (Fig.1.5.7.a & Fig.1.5.8.a).

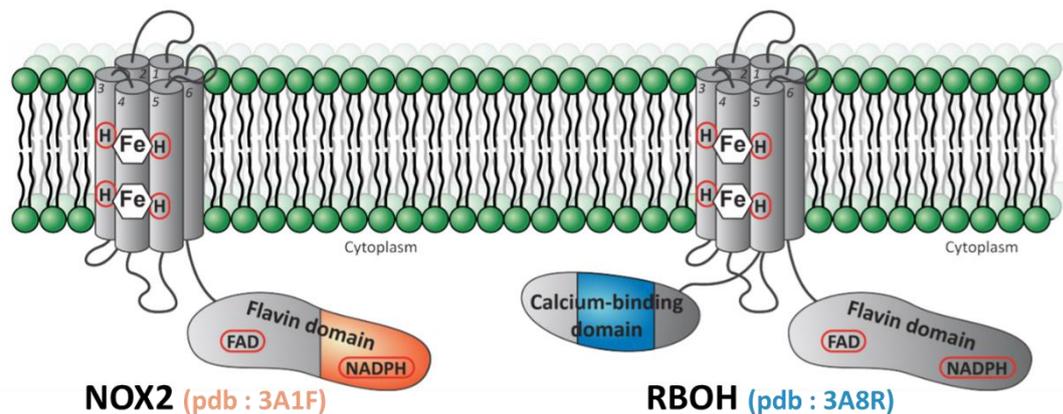


Fig.1.5.7 : Structures de la composante catalytique membranaire de la NADPH oxydase disponibles en 2016.

Le domaine de liaison au NADPH de NOX2, résolu par diffraction des rayons X en 2008 (3A1F – non publiée), a confirmé l'homologie structurale de ce domaine avec la famille des FNR (Fig.1.5.7.b & Fig.1.5.8.b). De plus, malgré la présence des résidus correspondant à la région NIS (484-504) dans le

domaine cristallisé, cette région n'est pas résolue au sein la structure suggérant une flexibilité intrinsèque de ce domaine NIS. Cette observation est en accord avec un rôle d'interrupteur généralement attribué à la région NIS, dont la conformation alterne entre différents états conformationnels, autorisant ou non la liaison du substrat NADPH au sein du site actif.

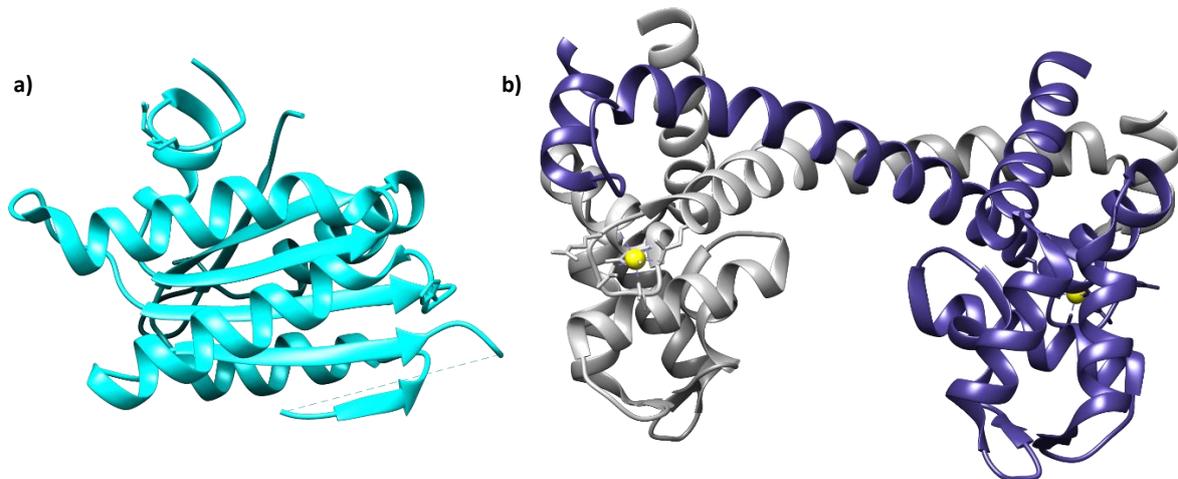


Fig.1.5.8 : Structures du domaine de liaison au NADPH de NOX2 et de la région N-ter de la RBOH de riz (OsRBOH). Ces structures ont été résolues par cristallographie aux rayons X à respectivement 2Å et 2.4Å. (a) Domaine de liaison au NADPH de NOX2. (b) Région N-ter de la RBOH de riz (*Oryza sativa*), les mains EF de chaque monomère sont respectivement représentées en gris et en bleu.

Similairement aux cellules eucaryotes, les plantes expriment des NADPH oxydases (RBOH) capables de générer des espèces réactives de l'oxygène constituant des facteurs majeurs de nombreux événements cellulaires. Les RBOH possèdent une région N-ter cytoplasmique particulièrement conservée incluant des mains EF structurellement proches de celles de NOX5, et impliquées dans la régulation de l'activité enzymatique. La résolution de la structure de la région N-ter de la RBOH de riz (OsRBOH) apporte ainsi des informations importantes concernant la NOX5 humaine [306]. Cette structure révèle ainsi que l'extrémité N-ter de la protéine forme un homodimère stabilisé par la super-hélice induite par l'entrecroisement des mains EF de chaque monomère. Des caractérisations biochimiques ont ensuite montré que cette dimérisation est nécessaire pour l'interaction de OsRBOH avec OsRac1 et que le domaine de liaison est localisé au niveau de la superhélice. De plus les données ont permis de mettre en évidence une main EF supplémentaire par monomère qui n'était pas prédite initialement d'après l'étude de la séquence protéique, et formant, avec la main EF impliquée dans la dimérisation, une structure similaire à la calcineurine B (CaN). Enfin des modifications structurales importantes ont été observées lors de la liaison de cette main EF supplémentaire avec les ions Ca^{2+} , témoignant l'existence d'un interrupteur conformationnel calcium-dépendant dans le domaine cytosolique des isoformes de type Nox5.

D. Manque important de données sur la partie membranaire

L'étude des structures disponibles au sein de la base de données PDB révèle ainsi un manque critique de données structurales sur les NOX humaines. Ainsi en 2016, lorsque les caractérisations structurales sur un homologue procaryote de NADPH oxydase présentées dans ce manuscrit ont été initiées, aucune structure concernant la séquence complète du cœur catalytique des NOX, ni même le domaine transmembranaire responsable du transfert d'électron du FAD jusqu'à l'oxygène moléculaire n'était disponible. Ainsi, les seules informations structurales accessibles sur ce domaine provenaient des prédictions issues de modèles d'homologies. Le manque d'informations structurales fiables entrave la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation et la production de ROS des NADPH oxydases et ralentit largement le développement d'inhibiteurs thérapeutiques. Afin de pallier aux difficultés liées à la production et solubilisation des NOX humaines en quantité suffisante pour les

études structurales, une nouvelle approche consiste en l'identification d'homologues procaryotes (Nox) des NADPH oxydases, dont la production serait moins contraignante, pour permettre la caractérisation structurale d'homologues procaryotes de NOX. Les informations ainsi extraites pourraient permettre, par analogie, de combler le vide structural existant au sein famille NOX. Cette stratégie, initiée au sein de différentes équipes, et détaillée dans les chapitres suivants, a notamment permis la résolution indépendante de chacun des domaines, respectivement TM et DH, d'un homologue procaryote de NOX5, dont l'analyse sera détaillée dans les chapitres suivants.

6

Approche bactérienne pour résoudre la structure des NOX

Jusqu'en 2008 les protéines de la famille des NADPH oxydases ont été considérées dans la littérature comme n'étant présentes qu'au sein des organismes eucaryotes [119]. Or, la surexpression de protéines membranaires eucaryotes nécessite des systèmes de production spécifiques permettant une synthèse plus élaborée, nécessitant par exemple l'utilisation de codons rares, ou des événements tels que des modifications post-traductionnelles, mais qui aboutissent généralement à de faibles rendements de protéines recombinantes, complexifiant ainsi la caractérisation des NOX. En revanche, la démonstration récente de l'existence de protéines procaryotes partageant des ancêtres communs aux NOX eucaryotes [307], a rendu possible le développement d'une approche alternative pour faire face aux difficultés associées à la caractérisation biochimique et structurale de ces protéines.

En effet, à travers la recherche d'homologues procaryotes présentant de fortes similitudes avec notamment NOX2, qui constitue le prototype de la famille des NOX, l'établissement d'une stratégie impliquant l'utilisation des systèmes bactériens pour l'expression et la production recombinante en quantités compatibles avec des études structurales devient ainsi envisageable.

Cependant, malgré la mise en évidence d'éléments en faveur d'une origine procaryote des NADPH oxydases dès 2004 dans les études indépendantes de [308] et [309], et s'intensifiant ensuite sur une dizaine d'années grâce aux contributions de différentes équipes de recherches fournissant de plus en plus de données supportant cette hypothèse, l'existence de NOX procaryotes n'a été confirmée que récemment, avec la découverte et la caractérisation biochimique du premier homologue procaryote de NOX2 issus de *Streptococcus pneumoniae*, SpNox, ainsi que la démonstration en 2017, à travers l'existence de caractéristiques communes partagées avec les sous-unités catalytiques, de l'appartenance de celui-ci à la famille des NOX.

La caractérisation structurale des homologues procaryotes de NOX permet ainsi d'apporter des informations transposables aux NOX eucaryotes permettant de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans le transfert d'électrons et apporte ainsi des connaissances indispensables au drug design.

1. Analyses phylogénétiques concernant l'origine des NOX

A. Analyses phylogénétiques à partir des séquences de NOX eucaryotes

En 2007, l'analyse bioinformatique d'un alignement de 101 séquences de NOX/DUOX a abouti à la création d'un arbre phylogénétique répertoriant toutes les espèces séquencées dont le génome présente un des gènes de la famille des NOX1-5/DUOX [104]. La recherche d'homologues de NOX parmi les différentes espèces révèle que la présence des NOX apparaît strictement restreinte au règne eucaryote, au sein de tous les supergroupes (opisthokonta, amoebzoa, plantae, excavata, rhizaria, chromalveolata) à l'exception des Rhizaires, suggérant ainsi l'apparition d'un ancêtre commun aux

gènes des NOX à un stade précoce de l'évolution des eucaryotes, qui pourrait trouver son origine au sein des organismes procaryotes.

En effet, avec Fre, une métalloréductase homologue issue des levures catalysant une réaction similaire au NOX, mais dont l'accepteur final est substitué par le Fe^{3+} , les NADPH oxydases constituent une superfamille de flavocytochromes permettant le transfert d'électrons à travers la membrane d'un grand nombre d'eucaryotes. Et bien qu'aucun élément n'indiquait en 2007 l'existence d'homologues procaryotes au sein de cette famille, l'indentification d'un motif bis-histidyl de liaison héminique, partagé par les membres de la superfamille, et commun au cytochrome bactérien *bc1*, suggère l'existence d'une relation évolutive et fonctionnelle entre le domaine transmembranaire de NOX et le cytochrome procaryote, renforçant ainsi l'hypothèse de l'existence d'un ancêtre commun lointain.

De plus, au sein de cette superfamille, le domaine déshydrogénase C-terminal partage également une homologie avec les Ferrédoxines NADP⁺ réductase (FNR) procaryotes présentant deux domaines de liaison respectivement au NADPH et FAD [119].

L'homologie existant entre cette structure bipartite, identifiée au sein des NOX, avec deux protéines procaryotes distinctes, respectivement de type cytochrome *b* et FNR, homologues à l'un (TM) et l'autre (DH) des domaines, a ainsi conduit à l'hypothèse qu'un gène ancestral codant pour une protéine transmembranaire liant deux hèmes telle que les cytochromes de type *b* aurait fusionné au cours de l'évolution eucaryote avec un gène de FNR, conduisant ainsi à l'émergence de l'ancêtre commun des familles NOX et FRE (Fig.1.6.1).

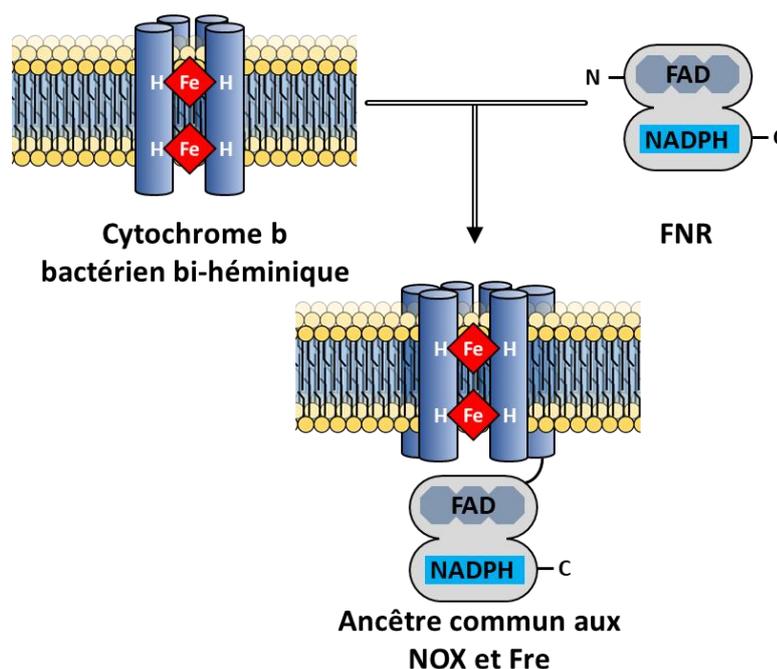


Fig.1.6.1: Apparition des protéines de la famille NOX ou Fre par la fusion de deux gènes ancestraux. Le domaine transmembranaire relié au cytochrome *b* est représenté en jaune et la partie ferrédoxine NADPH réductase en gris. Figure reproduite d'après [119].

Or, cette hypothèse est renforcée par l'existence d'un système similaire chez les plantes, faisant intervenir une interaction directe entre la FNR et le cytochrome *b6f*, contenant deux hèmes, permettant ainsi la formation transitoire d'un système à deux composantes pour la réalisation du transfert d'électrons, et démontrant également qu'une solution modulaire ait déjà existé au cours de l'évolution. Bien que non covalente initialement, il apparaît plausible qu'une telle interaction entre domaines ait pu conduire au cours de l'évolution à la fusion des protéines participant à un tel

mécanisme aboutissant ainsi à une architecture à deux domaines, similaire à celle observée au sein des NOX.

Il est probable que la protéine à l'origine de la famille des NOX eucaryotes ait ensuite divergé en se diversifiant pour répondre à des fonctions biologiques spécifiques. Ceci a pu se faire grâce à l'insertion de motifs ou de domaines de régulation ou l'acquisition de protéines étroitement associées en tant que sous-unité régulatrice, ainsi qu'à la diversification des lieux d'expressions, conduisant ainsi à l'apparition de différentes isoformes de NOX lors de l'évolution.

Face à l'absence d'identification directe d'homologues procaryotes de NOX, constituant un obstacle à l'étude structurale de ces protéines, et suite à l'établissement d'une relation phylogénétique entre chacun des domaines de la NOX et le règne procaryote, l'approche a été substituée par une recherche indirecte, consistant à rechercher indépendamment des homologues procaryotes pour chacun des domaines de NOX.

B. Recherches d'homologie sur des protéines plus éloignées des NOX

En 2004, deux études indépendantes réalisées initialement pour déterminer la fonction respective de protéines pour lesquelles aucun lien mutuel ou avec les NADPH oxydases n'avait jusqu'à lors été établi, constituaient les prémices de l'identification d'homologues de NOX au sein du règne procaryote en apparentant cette famille, *via* le domaine FRD transmembranaire N-ter, à YedZ, une oxydoréductase bactérienne, et à la famille des métalloréductases humaines STEAP, constituant ainsi un support à la recherche d'homologues procaryotes par domaines.

a. Des indices datant de 2004

1. YedZ : le lien avec les organismes bactériens

En 2004, suite aux projets de séquençage de génome, le système de classification des transporteurs regroupait de nombreuses familles de protéines supposées appartenir à cette classe mais demeurant non caractérisées, et pour lesquelles aucune donnée fonctionnelle fiable n'était donc connue. C'est dans ce contexte que la recherche de la fonction de la famille YedZ, une protéine héminique membranaire identifiée chez *E.coli*, a été initiée en caractérisant celle-ci à l'aide d'une analyse bioinformatique impliquant la recherche de motifs structuraux spécifiques ainsi que d'homologues, à l'aide d'alignements de séquences, d'études topologiques et phylogénétiques [308]. Celles-ci révèlent que la famille YedZ est constituée de protéines monomériques d'environ 200 résidus, exposant 6 segments transmembranaires qui résultent de la triplication intragénique d'un élément codant 2 hélices successives. Les alignements multiples de séquences homologues décrivent la présence, au sein des hélices 3 et 5, de motifs conservés comportant une glycine, ainsi que de plusieurs résidus histidines suggérant une fonction commune dans la liaison de groupements prosthétiques héminiques. La confrontation aux bases de données révèle l'existence d'homologues procaryotes et eucaryotes constitués de protéines membranaires intégrales de liaison aux hèmes dont le domaine de type YedZ peut être fusionné à des protéines exerçant diverses fonctions putatives de transporteurs (ex. ABC, perméase) ou de transfert d'électrons (ex. NOX, Disulfide oxidoreductase D (dsbD) procaryote).

Il est ainsi proposé que les homologues de YedZ, eucaryotes ou procaryotes, fonctionnent comme des protéines de liaison aux hèmes afin de faciliter ou réguler l'oxydoréduction et le flux d'électrons à travers la membrane, catalysé par le domaine de fusion.

Plus particulièrement, parmi les homologues identifiés au sein des animaux, des similarités de séquences ont été établies avec le domaine transmembranaire de STEAP, une famille de protéines

dont la fonction n'avait pas encore été identifiée et au sein de laquelle [309], le N-ter transmembranaire de type YedZ est fusionné avec des homologues de la NADP⁺:F420 oxydoréductase. A travers des similarités de séquences, des relations ont également été établies entre YedZ et une famille de protéines liant deux hèmes et contenant un cytochrome *b* impliquées dans le transfert d'électron à travers les membranes, et qui sera ultérieurement identifiée comme la famille des NOX, au sein de laquelle le domaine de type FNR est placé en C-ter du domaine TM de type YedZ, contrairement à l'architecture observée chez STEAP. La relation ainsi établie entre YedZ et les deux homologues humains STEAP et NOX constitue un élément supplémentaire en faveur d'une possible origine bactérienne du domaine transmembranaire des NOX, et démontre ainsi l'existence d'homologues structuraux procaryotes de celui-ci.

2. Le domaine transmembranaire FRD

Indépendamment des analyses bioinformatiques initiées avec YedZ, la recherche de la fonction d'une famille de protéines impliquées dans le cancer et l'apoptose et constituée de quatre membres (STEAP1-4), a également contribué, à travers l'identification d'homologues, à souligner l'existence de similitudes entre YedZ et les NOX, en permettant notamment la caractérisation d'un domaine transmembranaire (TM) à 6 hélices α intervenant dans le transfert d'électrons. Initialement nommé ACRATA [309], puis désigné par FRD (Ferric Reductase Domain) après l'identification de sa fonction, la recherche de similarités de séquences a révélé que ce domaine archétype est homologue à la région transmembranaire des NOX, ainsi qu'à l'oxydoréductase procaryote YedZ. Cette étude phylogénétique constitue donc l'un des premiers exemples de caractérisation établissant une connexion entre les familles STEAP, YedZ et NOX, qui constituent des protéines de liaison respectivement à un ou deux hèmes chacune impliquée dans des fonctions rédox, grâce à l'identification d'un domaine commun partagé par les trois familles de protéines suggérant à nouveau l'existence d'une relation de parenté entre les NOX et des protéines procaryotes de fonctions similaires constituant ainsi les premiers éléments en faveur de l'éventuelle découverte ultérieure de NADPH oxydases procaryotes.

b. Evolution de la superfamille FRD

La superfamille FRD regroupe toutes les protéines eucaryotes ou procaryotes possédant un domaine FRD. Les analyses bioinformatiques détaillées ont mis en valeur la phylogénie des gènes ainsi que la structure des membres de cette famille, démontrant que celle-ci existe dans une grande variété d'organismes dont de nombreuses espèces possédant de plusieurs copies de gènes, témoignant ainsi de l'importance de ce domaine essentiel à l'activité de nombreuses protéines [310]. Cette superfamille se compose notamment des protéines YedZ, STEAP, et des protéines NOX et FRE qui possèdent, en plus de la région FRD, des motifs conservés de liaison au NADPH et FAD au sein d'un domaine déshydrogénase additionnel permettant la catalyse du transfert d'électrons du NADPH cytosolique, respectivement à l'oxygène ou à un ion métallique extracellulaire. Afin de caractériser les relations évolutives associées à cette superfamille, une analyse phylogénétique a été conduite en incluant des homologues d'espèces provenant de nœuds des ramifications profondes de l'arbre des espèces, permettant ainsi d'indiquer que les familles et sous familles issues du domaine FRD initial aurait émergé très tôt dans l'évolution. Les résultats suggèrent que les protéines de type STEAP auraient dérivé des bactéries à la suite d'un transfert horizontal de gène à partir de YedZ, conduisant au partage d'une spécificité commune caractérisant ces deux familles consistant en la substitution de la première histidine, permettant de chélater l'hème au sein des NOX, par une arginine hautement conservée. De plus, les études suggèrent que les enzymes Fre sont apparues de manière précoce dans l'évolution, probablement à la base du clade des NOX, préalablement à un événement conduisant à la transition

vers les protéines de la famille NOX⁹ à travers l'acquisition de mains EF conduisant ainsi à l'émergence initiale des protéines de type Nox5/DUOX, puis à la perte successive de celles-ci dans un gène ancestral, qui serait à l'origine de l'apparition des isoformes Nox 1-4. Les étapes vers une complexité de régulations croissante dans l'ordre Nox 4, 3, 2, 1 peuvent être retracées au sein de la famille NOX, et s'accompagnent de la mise en place au sein de ce clade de nouveaux systèmes de régulations alternatifs, de complexité et spécificité accrues au fur et à mesure de l'évolution, à travers notamment la fusion du domaine FRD avec des modules additionnels ou l'intervention de sous-unités régulatrices. Il semble ainsi que les familles de protéines homologues NOX, YedZ et STEAP (constituant les 3 groupes de la superfamille) aient divergé à partir d'un domaine FRD commun partageant des similarités structurales avec le cytochrome *b* du complexe mitochondrial *bc1*, et dont l'apparition est probablement survenue suite à l'évolution d'un homologue procaryote.

c. YedZ un système à deux protéines procaryotes fonctionnellement apparentées aux NOX

Bien avant l'identification de sa fonction physiologique, l'analyse moléculaire montrait que l'ORF de YedZ est situé au sein du même opéron que son partenaire périplasmique à cofacteur molybdoptérine, codée par *yedY*. En absence de données biochimiques complémentaires, YedY/YedZ était alors perçu comme un système de transfert d'électrons transmembranaire (YedZ) à deux composantes entre une source cytosolique et une enzyme périplasmique (YedY) afin d'assurer une fonction redox, et il a ainsi fallu attendre 2015 [311] pour que la véritable fonction de l'opéron *yedYZ* soit révélée.

En effet, la caractérisation biochimique extensive récente a permis d'établir le rôle fonctionnel de YedZ au sein du système méthionine sulfoxyde réductase (Msr) constitué par YedY/YedZ, permettant la réparation des protéines périplasmiques oxydées par un stress HOCl, au cours duquel les méthionines sont oxydées en méthionines sulfoxydes. En catalysant la réduction des méthionines altérées, le système YedYZ permet le retour à la forme originale des méthionines, et constitue ainsi un mécanisme de défense à l'HOCl affectant les protéines périplasmiques, directement soumises au stress exogène. En accord avec sa fonction de méthionine sulfoxyde réductase, le complexe oxydoréductase YedYZ a donc été renommé MsrPQ. Au sein de celui-ci, la molybdoprotéine périplasmique MsrP, (initialement désignée YedY), conduit l'activité méthionine sulfoxyde réductase tandis que MsrQ (initialement YedZ), par l'intermédiaire de cofacteurs hémiques, permet la réduction des sulfoxydes en constituant le donneur spécifique d'électrons à MsrP, à laquelle MsrQ doit être spécifiquement associée pour être fonctionnelle *in vivo*.

Plus récemment, l'existence d'un système capable de fournir les électrons à MsrQ à partir du pool intracellulaire de NADPH a été identifié, permettant ainsi de proposer une source d'électrons alternative au pool de quinones liées aux membranes, notamment en cas de stress HOCl lorsque celui-ci est déficient.

A l'aide d'expériences de réticulation inter protéines et de résonance plasmonique de surface, permettant d'identifier des interactions entre partenaires protéiques, il a été établi que la NADPH Flavine Réductase (FRE), qui constitue un homologue du domaine déshydrogénase (DH) cytosolique de NOX2, pouvait, en présence de NADPH et FMN, réduire efficacement MsrQ à travers la formation d'un complexe spécifique FRE/MsrQ.

L'ensemble de ces résultats démontrent ainsi l'existence, au niveau procaryote, du premier système protéique à deux composants de transfert d'électrons à travers la membrane similaire à celui existant

⁹ La distinction des NOX (oxydoréductases) avec les Fre (métalloréductases) réside dans un motif de 4 résidus acides au sein des segments transmembranaires 3 et 4.

sous forme fusionnée dans les NOX, et au sein duquel, par analogie avec les NOX, FRE constituerait un domaine déshydrogénase cytosolique de type FNR, sous la forme d'un partenaire cytosolique soluble non associé.

Ainsi, le système MsrQ/FRE constituerait un intermédiaire procaryote préfigurant de l'apparition des NOX renforçant l'hypothèse de leur origine procaryote résultant de la fusion d'un cytochrome *b* membranaire, à l'origine du domaine FRD commun entre MsrQ, NOX et STEAP, avec un domaine déshydrogénase de type FNR, homologue entre FRE et la DH de NOX2, et apportant ainsi des éléments supplémentaires dans le sens de l'existence possible d'homologues procaryotes de NOX (Fig.1.6.2).

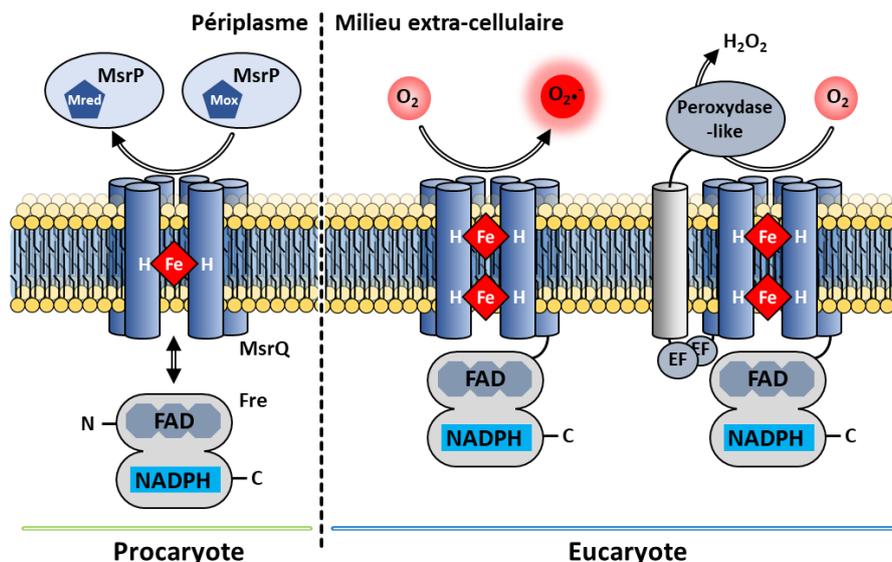


Fig1.6.2 : Comparaison topologique entre le système à deux composants MsrQ/Fre et les NOX et DUOX eucaryotes. Le domaine FRD enchâssés dans la membrane est représenté en bleu. Les domaines solubles FNR portant les sites de liaison au NADPH et FAD, mains EF et de type peroxydase sont représentés. Les accepteurs d'électrons de chaque système sont également représentés dans les compartiments périplasmique/extracellulaire correspondants. Adapté à partir de [311].

2. Découvertes expérimentales des Nox bactériennes

A. Découverte de la 1^{ère} Nox bactérienne (SpNox)

a. Identification des Nox procaryotes

Malgré l'accumulation de relations phylogénétiques en faveur de l'existence d'un ancêtre procaryote des NOX et la caractérisation d'un système bactérien à deux composants partageant un fonctionnement enzymatique similaire aux NOX, l'existence des NADPH oxydases est demeurée restreinte au règne eucaryote durant de nombreuses années.

En effet, des recherches par homologie de séquences (BLAST) utilisant les séquences des NOX eucaryotes ne permettaient pas de mettre en évidence de séquences d'origine procaryotique proches de ces enzymes.

Suite à un programme de séquençage de génomes d'espèces endémiques de Nouvelle-Zélande, réalisé postérieurement aux études évolutives initiales de 2008, et permettant l'actualisation des bases de données, la recherche d'homologues procaryotes de NOX a été entreprise à nouveau au sein du laboratoire en mettant à profit l'existence de ces nouvelles informations [307].

Ainsi, parmi les séquences rendues disponibles, des séquences de cyanobactéries indétectées jusqu'à lors bien que très proches des séquences de NOX eucaryotes, probablement en raison d'un transfert horizontal de gène au cours de l'évolution, ont alors pu être identifiées. En constituant un modèle intermédiaire satisfaisant une homologie de séquences suffisante, autant avec les NOX eucaryotes que d'éventuelles séquences procaryotes similaires à des NOX, l'utilisation de celles-ci a ainsi permis d'étendre la recherche à des séquences partageant moins de similarité avec les NOX, et qui n'auraient donc pas été identifiées directement à partir d'alignements multiples avec ces dernières.

Le groupe de séquences procaryotes homologues des séquences de cyanobactéries proches de NOX [312] ainsi extrait a ensuite été soumis à des alignements avec les séquences procaryotes et eucaryotes afin d'extraire des motifs caractéristiques communs avec les NOX eucaryotes.

Le développement d'un algorithme permettant le criblage systématique de ces motifs communs entre les NOX et ces séquences nouvellement identifiées a ensuite permis de poursuivre l'analyse en étendant la recherche d'homologues au sein de bases de données protéiques SwissProt et TrEMBL grâce à la confrontation de celles-ci à travers des étapes itératives de recherche des motifs caractéristiques des NOX eucaryotes plutôt que de séquences entières de protéines supposées trop distantes. Ce processus d'identification (Fig.1.6.3) se décompose en deux filtres successifs, débutant par la recherche initiale des motifs caractéristiques significatifs des NOX eucaryotes : (i) sites de liaison au NADPH et FAD (ii) deux motifs de liaison aux hèmes His-X12/14-His, permettant la sélection de potentielles séquences d'intérêts. Un second filtre permet ensuite de ne conserver que les séquences présentant au moins trois hélices α ainsi que deux motifs bis-histidyls séparés par la longueur d'une hélice (20 a.a) afin de reproduire les critères imposés au sein domaine cytochrome *b* où les hèmes sont chélatés par les hélices 3 et 5.

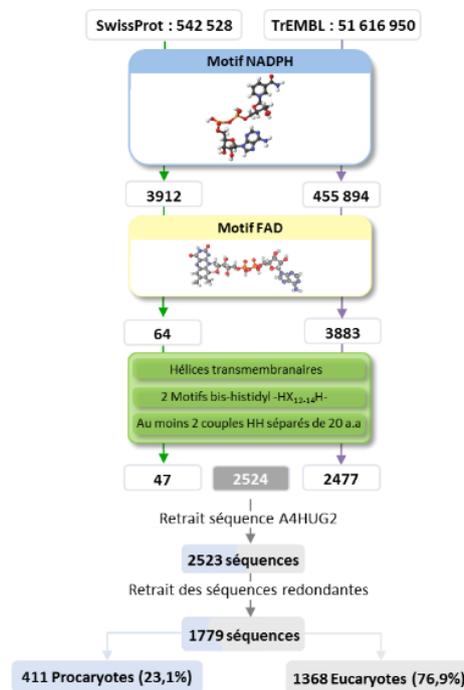


Fig.1.6.3 : Algorithme de recherche des homologues procaryotes de Nox [307]. Les différents filtres sont représentés selon leur ordre d'application. Les valeurs encadrées indiquent le nombre de séquences retenues après l'application séquentielle des filtres. Les séquences issues des deux bases de données ont été représentées séparément avant d'être regroupées après l'application du dernier filtre. Les valeurs encadrées en bleu font référence aux séquences d'organismes procaryotes, ou en gris aux séquences d'organismes eucaryotes.

A partir des 78 037 012 entrées des bases de données, l'algorithme a isolé 4404 séquences potentielles de NOX provenant de 1492 organismes différents dont 33% de bactéries. En retirant les séquences

présentant un degré d'homologie supérieur à 99% et provenant d'organismes apparentés, un nouvel arbre phylogénétique de la famille des NOX/FRE a été construit (Fig.1.6.4), proposant désormais un clade de protéines procaryotes apparentées largement significatif. L'apparition d'une scission nette entre les règnes procaryote et eucaryote témoigne de l'émergence de ces deux sous-groupes indépendants à partir d'un même ancêtre commun.

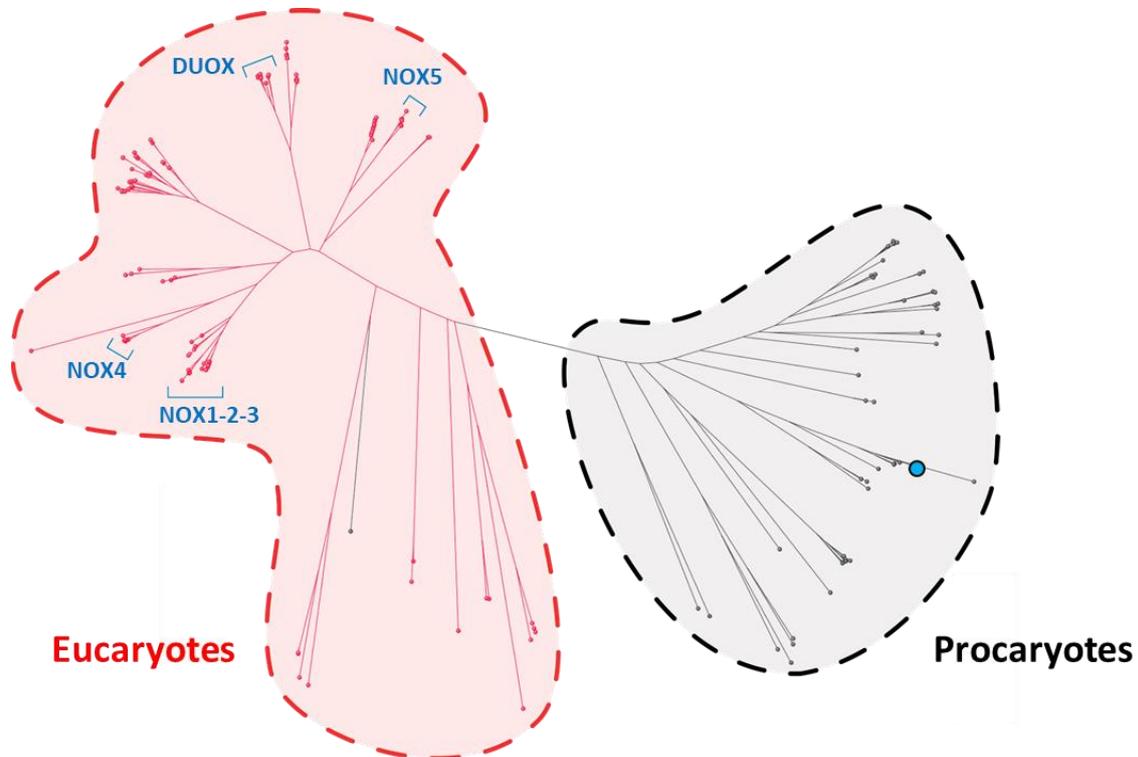


Fig1.6.4 : Arbre phylogénétique de la famille des NADPH oxydases. L'arbre a été construit en utilisant 162 séquences sur les 4404 identifiées par [307] et provenant des genres représentatifs de tous les domaines du vivant (56). Les séquences homologues issues des organismes eucaryotes (rouge) et procaryotes (noir) sont représentées et SpNox est représentée par le point bleu.

b. Sélection et purification de SpNox

Afin de confirmer la fonctionnalité des Nox bactériennes précédemment identifiées, plusieurs séquences procaryotes présentant une prédiction de topologie proche de NOX2 ont été sélectionnées et les protéines correspondantes ont été produites, puis, afin de valider l'intégrité et d'évaluer le contenu en hèmes de celles-ci, caractérisées par spectrométrie d'absorbance sous les forme oxydées et réduites. Parmi ces protéines, SpNox, un homologue issu de *Streptococcus pneumoniae*, dont la signature spectrale caractéristique des groupements héminiques présentait le plus fort signal, a été retenue pour la caractérisation approfondie de l'intégrité et de la fonctionnalité de celle-ci.

c. Preuves expérimentales de l'appartenance à la famille des Nox

La caractérisation biochimique et fonctionnelle extensive de SpNox a ensuite été initiée afin de valider son appartenance à la famille des NADPH oxydases. La présence des deux hèmes au sein de la protéine a ainsi été vérifiée grâce à la réalisation d'un spectre différentiel. De plus, par analogie avec NOX2, l'existence d'une activité NADPH oxydase a pu être détectée uniquement lors de la présence conjointe de SpNox et des coenzymes NADPH et FAD, confirmant ainsi que SpNox est capable de catalyser le transfert d'électron à travers la membrane. (Fig.1.6.5.a).

D'autres caractéristiques importantes, telles que la cyano-résistance, caractéristique de la consommation d'oxygène par les NOX humaines, ainsi que la sensibilité au Diphenylene iodonium

(DPI), connu pour être un inhibiteur des NOX, ont été évaluées (Fig.1.6.5.b,c). Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus démontre expérimentalement que SpNox constitue la première protéine procaryote identifiée comme appartenant à la famille des NADPH oxydases.

Cette découverte constitue ainsi une avancée majeure, en fournissant, grâce à une production procaryote facilitée, un outil accessible pour l'étude mécanistique et structurale de cette famille, dont les conclusions pourront être partiellement transposées aux NOX eucaryotes grâce à l'homologie existante entre ces protéines, et permettant ainsi une meilleure compréhension de ces enzymes.

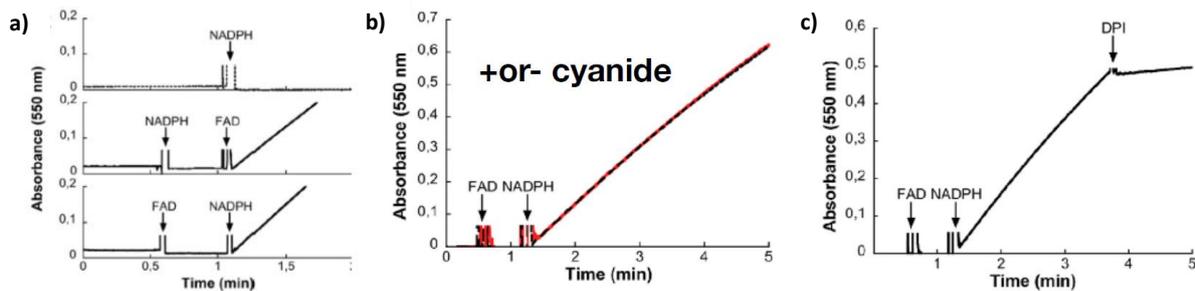


Fig1.6.5 : Caractérisation biochimique de l'activité cytochrome c réductase de SpNox. (a) L'activité NADPH oxydase de SpNox n'est observée qu'en présence du substrat NADPH et du cofacteur FAD simultanément et n'est pas impactée par l'ajout de cyanure (b), mais présente une forte inhibition en présence de DPI (c).

B. Caractérisation structurale d'une Nox procaryote (CsNox)

En adoptant une approche similaire, l'équipe de F. Magnani a récemment rapporté la caractérisation biochimique et structurale des domaines transmembranaire et déshydrogénase séparés d'un homologue procaryote de Nox5, CsNox issu de *Cylindrospermum stagnale* [313]. La cristallisation de CsNox sous forme entière s'est révélée impossible, et sa caractérisation structurale a ainsi nécessité une stratégie impliquant la production et caractérisation structurale indépendante des deux domaines isolés de la protéine.

Ainsi, la structure du domaine DH (de type FNR) de CsNox a pu être résolue à partir de cristaux obtenus en phase vapeur (Partie II). La comparaison de ce domaine avec le site de liaison au NADPH de NOX2 démontre de grandes similitudes entre les deux structures. En revanche, le domaine TM (de type FRD) n'a pu être résolu que par l'utilisation de la cristallisation en phase cubique lipidique (LCP) (Partie II), constituant une technique développée spécifiquement pour l'étude structurale des protéines membranaires (Fig.1.6.6).



Fig1.6.6 : Structure des domaines DH et TM de CsNox. Les domaines DH (a) et TM (b) de CsNox ont été résolus par diffraction des rayons X à des résolutions respectives de 2.2Å et 2.05Å.

A l'aide des données acquises indépendamment à partir de chacun des domaines de CsNox, les auteurs ont ensuite tenté d'établir un modèle de la protéine entière, en organisant chacun des domaines dans l'espace sur la base des critères suivants :

- La surface interne du domaine TM est particulièrement complémentaire de la forme bilobale du domaine DH au sein de laquelle le cycle adénosine de la flavine est exposé.
- L'extrémité C-terminale du domaine transmembranaire TM doit nécessairement être proche de la région N-terminale du domaine déshydrogénase DH.

Les structures des deux domaines ont ainsi été ancrées informatiquement afin de générer un modèle au sein duquel les domaines TM-DH sont associés afin de reconstituer au mieux l'organisation putative correspondant à la protéine entière. Celui-ci propose ainsi un positionnement du FAD compatible avec un transfert électronique vers l'hème proximal du TM. Le modèle de protéine entière apporté par le TM-DH semble également positionner les boucles inter hélices B et D du TM au contact d'éléments spécifiques du DH, semblant ainsi confirmer les hypothèses formulées au cours d'études préalables suggérant l'implication de ces boucles dans la régulation de l'activité enzymatique [314, 145].

Malgré ces résultats, la modélisation de CsNox sous forme entière ne fournit qu'une information putative du transfert d'électron catalysé par l'enzyme, et bien que de nombreuses données puissent être confrontées aux études fonctionnelles réalisées au sein de la famille des NOX, des incertitudes persistent concernant l'interaction entre les deux domaines. En effet, bien que les résultats de l'ancrage des deux domaines donnent une vision globale utile, celui-ci révèle l'existence de conflits stériques entre les domaines DH et TM ainsi superposés, notamment dans la région à proximité du site de positionnement du FAD, suggérant que des modifications structurales significatives pourraient intervenir au sein la protéine entière.

De plus, l'échec de cristallisation de la protéine CsNox sous forme entière, contrairement aux résultats obtenus à partir de chacun des sous domaines isolés, respectivement TM et DH, suggère une flexibilité probable à l'interface des domaines respectifs, indiquant ainsi que la protéine pourrait ne pas être aussi compacte ou rigide que présentée à partir de l'ancrage des sous-domaines. En absence de réelle caractérisation d'interaction survenant entre les domaines et fournissant des détails qui permettrait de comprendre des propriétés essentielles de l'enzymes au niveau moléculaire, telles que son fonctionnement et notamment son mécanisme d'activation, l'étude structurale des NOX reste un enjeu majeur et représente un prérequis indispensable vers une meilleure compréhension des membres de cette famille.

Les espèces réactives de l'oxygène sont capables de réagir de manière préférentielle avec certains atomes au sein des macromolécules biologiques. Dans le cas des protéines, les altérations subies, modifiant parfois certaines chaînes latérales d'acides aminés critiques pour l'intégrité ou la fonction de la protéine, peuvent engendrer des conséquences dramatiques pour l'organisme.

Cependant, en raison de leur capacité de réaction spécifique avec un grand nombre d'atomes, les ROS peuvent intervenir dans des processus de signalisation redox pour moduler des fonctions diverses participant, en raison de la pléiotropie des ROS, à de nombreux processus physiologiques pouvant s'étendre de la régulation de l'homéostasie à l'apoptose cellulaire, ainsi que l'immunité à travers de nombreuses isoformes dont les fonctions spécifiques diverses varient en fonction de la localisation de celles-ci au sein de divers types cellulaires et différents tissus d'expression, élargissant ainsi l'effet des ROS au sein de la signalisation redox par la propagation de signaux permettant d'activer ou inhiber un grand nombre de protéines effectrices. Ainsi, en tant qu'enzyme spécialisée dans la production de ROS, le rôle des NADPH oxydases s'étend à de nombreux des processus physiologiques critiques, dont la dérégulation peut conduire à une grande variété de pathologies sévères, conférant ainsi ces enzymes un potentiel thérapeutique élevé.

Dans ce contexte, l'étude structurale et fonctionnelle des NOX représente un enjeu fondamental pour accéder à des informations au niveau moléculaire primordiales pour décrypter le mécanisme d'activation complexe à l'origine du transfert d'électrons à travers les membranes catalysé par ces enzymes, notamment dans le but de concevoir des médicaments spécifiquement adaptés pour moduler l'activité des membres de cette famille de protéines. Cependant, en raison des difficultés liées à la production des protéines membranaires eucaryotes, complexifiée par la présence de larges zones hydrophobes, les seules informations structurales disponibles sur les NOX humaines sont restées limitées à des parties fragmentaires de partenaires cytosoliques, insuffisantes pour permettre la compréhension des détails du mécanisme d'activation de ces enzymes.

Dans ces conditions, la découverte récente d'homologues procaryotes, partageant les caractéristiques communes des NOX, représente une avancée majeure vers la compréhension du fonctionnement des membres de la famille des NADPH oxydases. Parmi ceux-ci, SpNox issue de *Streptococcus pneumoniae*, a pu, avant mon arrivée en thèse, être exprimée et purifiée avec succès dans des quantités compatibles pour les études structurales. Cependant, bien que des cristaux aient pu être obtenus, les essais préliminaires de caractérisation structurale sur SpNox avaient invariablement conduit à des solutions dont la qualité de diffraction était insuffisante pour extraire des informations sur les cristaux.

Ainsi, à travers l'utilisation d'une approche interdisciplinaire associant différentes techniques complémentaires telles que la cristallographie aux rayons X ou le SANS, permettant l'étude de SpNox selon différentes échelles de résolution simultanément aux études fonctionnelles, ce projet a ainsi pour objectif majeur de relever les enjeux ambitieux liés à l'obtention de cristaux de protéines membranaires dont la qualité de diffraction permettrait pour la caractérisation structurale de SpNox, permettant ainsi proposer un modèle pour l'étude de la mécanistique enzymatique des membres de la famille des NADPH oxydases.

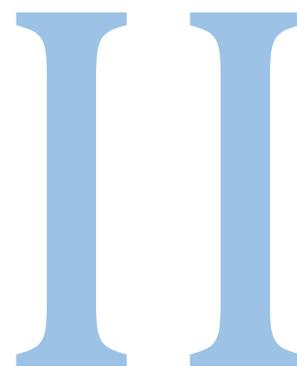
Ce projet audacieux sera notamment abordé à travers une approche intégrative impliquant :

- L'optimisation de la thermostabilité de SpNox à l'aide d'une approche impliquant le criblage systématique de divers paramètres tels que le détergent, le sel ou le pH, capables d'influencer la stabilité de l'enzyme, évaluée par fluorimétrie différentielle à balayage (nanoDSF), et réalisée en parallèle de la caractérisation de l'activité enzymatique de la protéine de manière à identifier des conditions optimales afin de favoriser le maintien de SpNox en solution et ainsi garantir l'intégrité structurale de la protéine. Les paramètres expérimentaux ainsi extraits seront ensuite fixés lors de la purification afin d'assurer l'homogénéité, l'activité ainsi que la stabilité de l'échantillon préalablement aux études structurales et biochimiques
- L'identification des conditions favorables à la croissance des cristaux de SpNox sera ensuite réalisée à travers le criblage haut débit et manuel à l'aide de différentes techniques de cristallisation appliquées sur diverses constructions de la protéine entières ou sur chacun des domaines isolés, permettant ainsi une étude approfondie des paramètres influençant favorablement la cristallogenèse
- Une stratégie complémentaire, impliquant la caractérisation basse résolution de SpNox par l'utilisation de la diffusion des neutrons aux petits angles, permettant d'accéder à des informations plus globales à l'échelle de la protéine entière, telles que la forme générale ou l'état d'oligomérisation de l'enzyme. Cela pourrait permettre, dans le cas où des informations structurales à plus haute résolution demeureraient inaccessibles, d'accéder à des données sur l'agencement des domaines de la protéine en solution, et pourrait apporter des informations qui pourraient finalement participer à faciliter le criblage des conditions de cristallogenèse. En absence de données structurales hautes résolution, un modèle d'homologie sera développé et confronté à la solution extraite de l'étude SANS afin d'évaluer la correspondance de celui-ci avec l'enveloppe déterminée.
- La réalisation d'études fonctionnelles conjointes permettra d'explorer le mécanisme enzymatique, à travers la caractérisation des interactions entre SpNox et ses cofacteurs et, si nécessaire, d'ajuster les paramètres expérimentaux favorablement à l'étude structurale.
- Enfin, l'élaboration de chimères fusionnant le domaine transmembranaire de SpNox avec le domaine déshydrogénase d'isoformes de NOX humaines permettra l'étude de la fonction et des processus de régulation des NOX et constituerait un outil pour l'étude fonctionnelle et structurale des NADPH oxydase eucaryotes, encore trop complexe à ce jour.

Ainsi, cette stratégie pourrait ainsi permettre d'améliorer la qualité de diffraction des cristaux initiaux et pourrait aboutir, à travers l'acquisition et l'interprétation de caractéristiques structurales et enzymatiques, à des progrès considérables vers la compréhension plus approfondie de la mécanistique des enzymes de la familles des NOX, et représenterait alors une contribution fondamentale pour la sélection d'éventuelles molécules permettant la régulation de l'activité des NOX essentielle à la conception de médicaments spécifiques de certaines isoformes de NADPH oxydases.

MATERIEL & METHODES

Caractérisation structurale et
biochimique



1

Principes de caractérisations structurales et biochimiques

1. Introduction

Les protéines occupent un rôle essentiel au sein de systèmes macromoléculaires biologiques et la détermination de leur structure, en apportant des connaissances indispensables à la prédiction de leur fonction respective, apparaît essentielle à la compréhension des processus physiologiques dans leur intégralité. L'accès à des informations structurales tridimensionnelles à haute résolution, en plus de permettre la caractérisation d'événements moléculaires à l'origine de la réalisation de mécanismes cellulaires complexes, permet d'accéder aux détails atomiques des protéines ainsi qu'à la nature des interactions qu'elles établissent avec de petites molécules telles que des cofacteurs, substrats ou inhibiteurs au sein du site actif [1].

Ainsi, l'approche structurale a pour but de déterminer à l'échelle atomique la structure tridimensionnelle des biomolécules par l'intermédiaire de moyens biophysiques tels que la diffraction des rayons X ou la résonance magnétique nucléaire. L'élaboration de modèles basés sur les données structurales expérimentales permet l'identification d'acides aminés cruciaux pour le maintien de la structure globale de la protéine, déterminant sa fonction, ainsi que la visualisation des détails de l'organisation des résidus, notamment au niveau du site catalytique, permettant la compréhension des mécanismes enzymatiques. Ces informations, en permettant la synthèse de molécules conçues pour moduler l'activité d'une protéine spécifique, constituent un support essentiel à la découverte de nouveaux médicaments [2].

Les récents développements dans les diverses techniques ont induit une révolution de la biologie structurale et profondément transformé la discipline, en créant ainsi de nouvelles manières d'appréhender et de comprendre les molécules biologiques ainsi que leur fonctionnement par des approches hybrides [3].

Cependant l'étude de protéines flexibles composées de plusieurs domaines structurés connectés par des segments désordonnés selon les techniques conventionnelles demeure difficile [4], et se trouve encore complexifiée par le fait que certaines macromolécules peuvent subir des changements conformationnels. En plus de la structure, l'identification des interactions entre les sous-unités d'un complexe peut se révéler essentielle pour la compréhension de mécanismes tels que la régulation ou l'identification de sites d'inhibition [5]. Ainsi, la biologie structurale ne repose plus sur l'usage d'une unique technique pour obtenir des données haute résolution. En effet, la combinaison de multiples stratégies expérimentales et théoriques complémentaires [6] impliquant des méthodes performantes, telles que la microscopie électronique cryo monoparticule (Cryo-EM), la cristallographie aux rayons X ou la dynamique moléculaire (MD), ainsi que des techniques permettant l'acquisition de données à plus basse résolution, telles que les techniques de diffusion aux petits angles, peut désormais être envisagée pour appréhender l'ensemble des interactions entre domaines protéiques et accéder à une meilleure compréhension du fonctionnement des systèmes biologiques en intégrant des données atomiques au sein d'enveloppes globales (Fig.2.1.1) [7, 8].

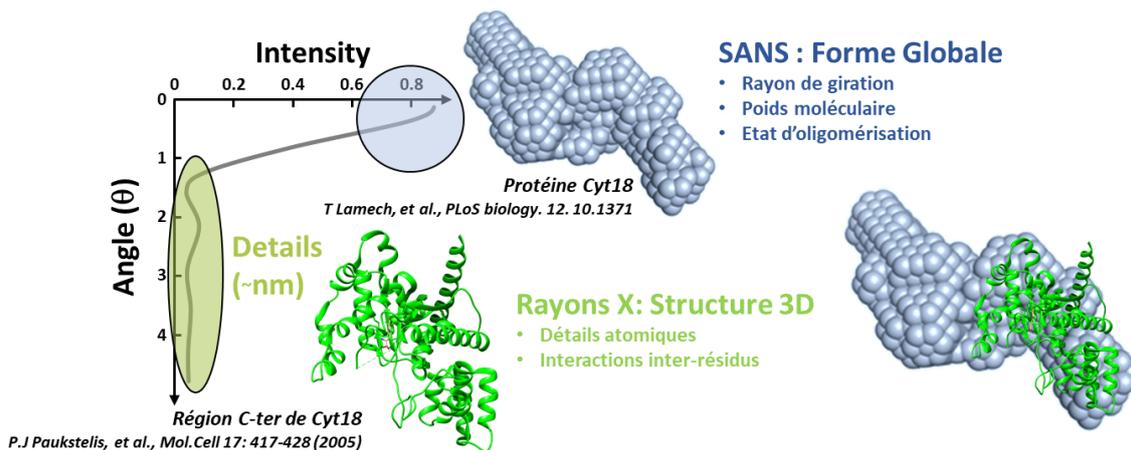


Fig.2.1.1 : Exemple d'approche intégrative pour l'étude structurale de la protéine Cyt18. La forme globale de la protéine a été obtenue par SANS. En absence de cristallisation de la protéine complète, la structure du domaine C-ter de la protéine a été résolue par cristallographie aux rayons X et peut être repositionnée au sein de l'enveloppe SANS. L'ancrage montré dans cette figure ne présente aucun caractère réaliste et n'est présentée que dans le but d'illustrer les avantages d'une approche intégrative.

L'obtention de la structure d'une macromolécule, bien qu'essentielle, n'est généralement pas nécessairement suffisante pour fournir de nouvelles connaissances sur la compréhension de la fonction d'une macromolécule et doit être enrichie par des approches moléculaires et cellulaires pour décrypter les mécanismes enzymatiques et régulateurs [9].

2. Les Techniques de Biologie Structurale

La cristallographie aux rayons X, ayant conduit à la résolution de 90% des structures disponibles [10], constitue une des techniques privilégiées pour l'obtention d'informations structurales au niveau atomique, cependant les améliorations récentes ont permis l'émergence de structures par d'autres approches telles que la RMN ou microscopie électronique, ou encore une combinaison des multiples techniques pour établir les relations entre différents éléments de base constituant les complexes moléculaires de taille supérieure.

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) constitue une technique adaptée à l'étude de protéines en solution de petite à moyenne taille, permettant, sous l'effet d'un champ magnétique, l'acquisition d'informations structurales à haute résolution en s'affranchissant du processus de cristallogenèse, représentant souvent une étape limitante. L'un des avantages majeurs de la RMN réside dans l'étendue de son domaine d'application, permettant également l'étude de protéines flexibles en solution ainsi que la dynamique biomoléculaire des protéines intrinsèquement désordonnées [11].

Contrairement aux autres méthodes, la cryoEM permet d'imager directement les biomolécules. Bien que longtemps limitée à des résolutions maximales entre 6 et 8Å, insuffisantes pour permettre la visualisation de détails atomiques, l'accomplissement de progrès techniques spectaculaires au cours des dernières années [12], avec l'apparition de nouveaux détecteurs, ont révolutionné le domaine en conduisant à l'obtention de données structurale pouvant atteindre jusqu'à 2.2Å [13]. Cette technique permet également, grâce à l'analyse mono-particule des images, la caractérisation de systèmes flexibles dans de multiples conformations. Enfin cette méthode est particulièrement adaptée à l'étude de systèmes biologiques complexes, telles que les machines moléculaires à plusieurs sous-unités ou les protéines membranaires, pour lesquels aucune donnée structurale n'avait pu être acquise, généralement en raison de la difficulté à obtenir des cristaux de qualité suffisante.

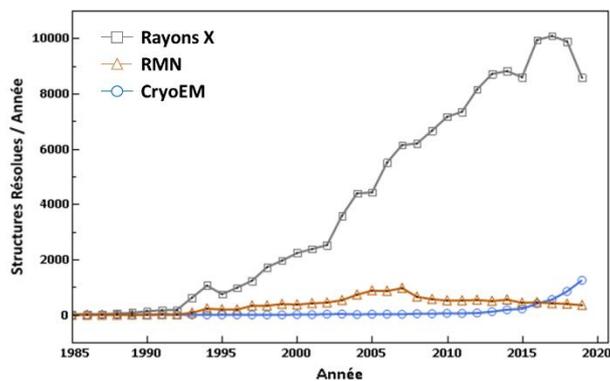


Fig.2.1.2 : Evolution du nombre de structures résolues par année en fonction de la technique utilisée. -□- Structures résolues par cristallographie aux rayons X, -○- Structures résolues par Cryo-EM, -△- Structures résolues par RMN.

Bien que les technologies telles que la RMN et, plus récemment, la microscopie électronique cryogénique, aient considérablement progressées, la cristallographie au rayon X demeure la technique privilégiée pour l'obtention de données structurales des macromolécules à très haute résolution (Fig.2.1.2). Avec les améliorations constantes liées à l'utilisation de la robotique (permettant le criblage haut débit et une collecte des données plus rapide), le développement de rayonnements synchrotron plus performants, ainsi que l'automatisation du processus de résolution de structures avec l'émergence d'outils pour la validation rigoureuse des modèles, cette approche demeure essentielle pour traduire les données structurales en interprétations chimiques et mécanistiques de leur fonction, pouvant être complétées par d'autres méthodes pour fournir un modèle plus complet.

L'application de la cristallographie aux rayons X pour l'obtention de données structurales est cependant strictement conditionnée par l'obtention préalable de cristaux de macromolécules, de taille et qualité suffisante pour permettre une collecte de données précise, et dont l'obtention constitue ainsi généralement le facteur limitant du processus. Au sein des cristaux, les protéines sont orientées de manière homogène selon un motif répété dans toutes les directions de l'espace et définissant l'empilement cristallin. En raison du nombre important de conformations que peuvent prendre les régions flexibles d'une macromolécule au sein des cristaux, le signal concernant ces éléments est perdu et cette technique ne permet donc pas d'imager ceux-ci. La qualité des données collectées, et ainsi du modèle structural final, est directement dépendante des propriétés physiques au sein du cristal.

L'existence de techniques de diffusion basses résolution complémentaires, telles que le SAXS ou le SANS, permettant l'étude de molécules en solution et pouvant être utilisées pour visualiser de conformations intermédiaires adoptées par des protéines multi-domaines ou de large complexe multiprotéiques, se révèle particulièrement utiles lorsque la structure des composants individuels est déjà connue par d'autres approches structurales.

Au cours de ce travail de thèse, l'étude structurale de SpNox a été menée par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) permettant de renseigner sur la forme de la protéine ainsi que par cristallographie aux rayons afin d'accéder aux détails atomiques.

3. Cristallographie aux Rayons X

A. Découverte des Rayons X

Les rayons X, découverts en 1895 par Wilhelm Röntgen, constituent un type de rayonnement jusqu'à lors non identifié et caractérisé par une longueur d'onde de l'ordre de 10^{-10} m [14]. En raison de leur caractère ondulatoire, l'interaction des rayons X avec des motifs dont l'espacement périodique est proche de la longueur d'onde du rayonnement conduit à un phénomène de diffraction.

L'hypothèse que les atomes composant la matière constituent le motif élémentaire d'un réseau cristallin périodique dont les distances interatomiques sont de l'ordre de l'angström, permettant ainsi la diffraction des rayons X, a initialement émergé de recherches sur la physique du solide conduites par Max Von Laue [15]. L'irradiation, en 1912, d'un cristal de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ placé devant une plaque photographique par un faisceau de rayon X, conduisant ainsi à l'obtention du premier cliché de diffraction d'un réseau atomique cristallin, a finalement permis à Friedrich et Knipping de démontrer l'existence d'un tel phénomène [16]. Cependant l'absence de lentille optique permettant de focaliser les rayonnements de telles longueur d'onde, aucune donnée ne peut être alors extraite à partir de cette diffraction.

L'interprétation de ces clichés sera finalement permise grâce à la loi empirique établie par Lawrence et William Bragg [17] établissant que le résultat de l'interaction des rayons X avec le nuage électronique contient l'ensemble des informations concernant les coordonnées des atomes au sein du cristal, révélant ainsi des informations à l'échelle atomique sur la structure même des matériaux. L'ensemble de ces travaux, récompensés en 1915 par un prix Nobel de physique, permet ainsi l'application de la cristallographie des rayons X aux matériaux solides.

L'application de cette technique d'analyse structurale aux protéines a finalement émergé 20 ans plus tard avec la démonstration par J. D. Bernal et Hodgkin que la diffraction suivant la loi de Bragg n'est pas exclusive aux sels, et s'applique également aux cristaux de macromolécules biologiques [18].

La démonstration par Perutz et Kendrew que l'introduction d'atomes de métaux lourds au sein des protéines conduit à une modification suffisante du pattern de diffraction pour permettre la résolution du problème des phases, qui constituait alors l'obstacle principal à l'analyse des données de diffraction, a abouti, en 1959, à l'obtention des premières structures de protéines à partir de cristaux de myoglobine et hémoglobine à des résolutions respectives de 5.5Å et 2Å [19]. Ces avancées ont conduit à la compréhension du mécanisme moléculaire responsable de la liaison et du transport de l'oxygène, initiant ainsi l'utilisation de cette technique pour l'étude des processus biologiques à un niveau atomique.

Depuis, les progrès techniques réalisés au niveau du traitement de données avec le développement de machines de calcul plus performantes, ainsi que l'amélioration conjointe des sources de rayons X et des détecteurs, conduisant à une réduction considérable du temps nécessaire à l'acquisition et à la résolution des données de diffraction, a établi la cristallographie des rayons X comme l'une des méthodes privilégiées pour l'analyse structurale des protéines.

B. Principe de diffraction des Rayons X

Le phénomène de diffraction associé à tout type de rayonnement est lié au caractère ondulatoire de la lumière à l'origine de la création d'interférences destructives ou constructives d'ondes cohérentes diffusées par les motifs d'un réseau dont la périodicité est proche de la longueur d'onde du rayonnement.

En raison de la longueur d'onde des rayons X de l'ordre de 10^{-10}m , les distances interatomiques de l'ordre de l'angström au sein d'un cristal de protéine fournissent un motif particulièrement adapté à la diffraction du rayonnement par le nuage électronique des atomes constituant les protéines

C. Diffusion des rayons X à deux électrons

Lors de l'interaction d'un rayon X avec un électron, l'énergie acquise par l'électron est renvoyée dans toutes les directions de l'espace sous la forme d'un rayonnement de même longueur d'onde que le rayon X incident. Lorsque deux électrons e_1 et e_2 , séparés par une distance r , sont soumis à un rayonnement X de longueur d'onde λ et de vecteur incident s , les rayons X émis par ces deux électrons

selon la direction s présente une différence de phase résultant d'un chemin optique plus long parcouru par l'un des deux rayons (Fig.2.1.3.a).

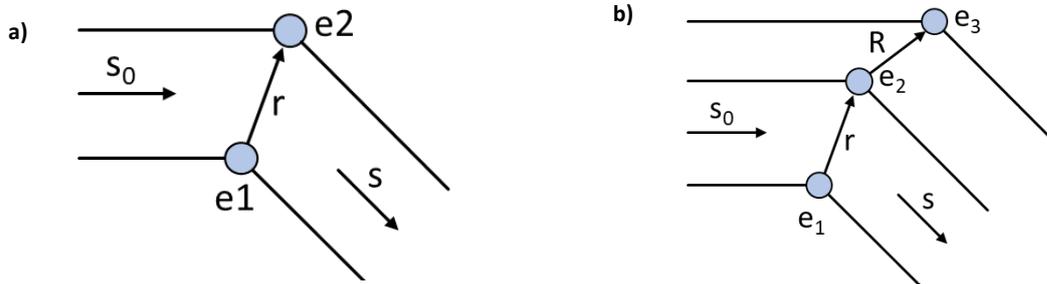


Fig.2.1.3 : Phénomène d'interaction des rayons X avec la matière en présence de 2 ou 3 électrons. Les rayons réémis par les électrons e_1 et e_2 (a) ou e_1 , e_2 et e_3 (b) présentent une différence de phase provenant de la différence de chemins optiques.

Cette différence de phase ($d\phi$) ainsi que le rayon T issu de la somme de ces deux rayons émis s'expriment respectivement par :

$$d\Phi = \frac{2\pi\lambda\mathbf{r} \cdot (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)}{\lambda} \quad 2.1$$

$$T = \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)) \quad 2.2$$

De manière similaire, dans le cas de trois électrons (Fig.2.1.3.b) le facteur de diffusion désignant l'onde résultante de la somme des rayons émis par l'ensemble des électrons, en prenant la position de e_1 comme référence s'exprime par :

$$T = \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) + \exp(2\pi i (\mathbf{r} + \mathbf{R}) \cdot \mathbf{S}) \quad 2.3$$

où \vec{S} définit le vecteur de diffusion $\mathbf{s} - \mathbf{s}_0$.

D. Diffusion des rayons X par un atome

Un atome est composé d'un nuage d'électrons dont les positions par rapport au noyau atomique, défini comme origine, sont données par la densité électronique. Lorsque cet atome est soumis à un rayonnement X incident, le facteur de diffusion de l'atome (f) correspond à la somme des rayons émis par chacun des électrons de l'atome. Comme les électrons au sein du nuage peuvent se situer dans toutes les positions \mathbf{r} de l'espace suivant la probabilité de présence $p(\mathbf{r})$, cette somme prend la forme d'une intégrale sur l'ensemble des \mathbf{r} de l'espace.

$$f = \int \exp(2\pi i (\mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{r}) \quad 2.4$$

La probabilité de présence des électrons autour du noyau étant centrosymétrique par rapport au noyau, f peut être simplifié en limitant l'intégrale à la moitié des positions de l'espace. De plus, au sein d'un cristal, cette probabilité est considérée indépendante de l'angle autour du noyau, et l'orientation de l'atome par rapport aux directions d'incidence et d'émission des rayons X n'entre pas en compte lors du calcul du facteur de diffusion. Celui-ci ne dépend donc plus que de son amplitude $|\mathbf{S}|$:

$$|\mathbf{S}| = \frac{2\sin\theta}{\lambda} \quad 2.5$$

où θ définit l'angle formé par le rayonnement émis par rapport au rayon incident. Pour chaque atome, et pour une longueur d'onde définie, il est ainsi possible de calculer la valeur du facteur de diffusion en fonction de l'angle θ (Fig.2.1.4).

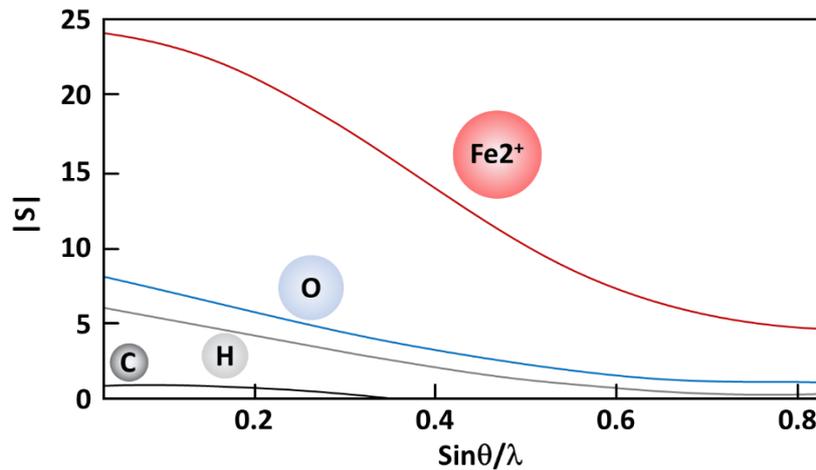


Fig.2.1.4 : Exemples de courbe d'évolution du facteur de diffusion des atomes en fonction du rapport $\sin\theta/\lambda$. Le facteur de diffusion des atomes ne dépend que de son amplitude $|S|$ variant selon la nature de l'atome : ion ferreux Fe^{2+} (rouge), oxygène (bleu), hydrogène (gris) et carbone (noir), et le rapport $\sin\theta/\lambda$.

a. Diffraction des rayons X par une protéine

Une protéine est constituée d'un ensemble d'atomes à des positions fixes de l'espace (r_i) imposées par la structure tridimensionnelle des acides aminés, dont chaque atome diffuse selon son propre facteur de diffusion f_i . Lorsque la protéine est exposée aux rayons X, chaque atome contribue alors au rayonnement émis par la protéine selon la formule :

$$f_i(\mathbf{S}) = f_i \exp(2\pi i (\mathbf{r}_i \cdot \mathbf{S})) \quad 2.6$$

Il devient alors possible de calculer le facteur de forme de la protéine, définissant le rayonnement émis par l'ensemble des atomes composant la macromolécule.

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{\text{atomes}} f_i \exp(2\pi i (\mathbf{r}_i \cdot \mathbf{S})) \quad 2.7$$

Le facteur de forme associé à une protéine représente l'ensemble des informations définissant la structure tridimensionnelle de celle-ci. Cependant, l'utilisation de cristaux, définis par l'arrangement ordonné et périodique suivant les trois directions de l'espace de protéines toutes orientées dans la même direction est indispensable pour amplifier le signal de diffraction de la protéine d'intérêt.

b. Diffraction des rayons X par un cristal de protéine

Les cristaux sont définis par un arrangement ordonné et périodique de mailles, elles même constituées d'un motif élémentaire de protéines ainsi que par leurs vecteurs de translation \mathbf{a} , \mathbf{b} et \mathbf{c} définissant la direction et la périodicité de répétition de la maille élémentaire. Pour obtenir l'onde diffusée par le cristal, il est nécessaire d'additionner le facteur de forme de chaque maille $F(\mathbf{S})$ en prenant en compte sa position par rapport au nœud d'origine du cristal. La position \mathbf{P} de toute maille dans le cristal est définie par la somme vectorielle selon un nombre entier de translations dans les trois directions du cristal :

$$\mathbf{P} = t\mathbf{a} + u\mathbf{b} + v\mathbf{c} \quad 2.8$$

Pour une direction d'émission donnée, l'onde finale émise par le cristal $W(\mathbf{S})$ peut ainsi s'écrire :

$$W(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S}) \times \sum_t \exp(2\pi i (\mathbf{t}\mathbf{a} \cdot \mathbf{S})) \times \sum_u \exp(2\pi i (\mathbf{u}\mathbf{b} \cdot \mathbf{S})) \times \sum_v \exp(2\pi i (\mathbf{v}\mathbf{c} \cdot \mathbf{S})) \quad 2.9$$

En raison du caractère périodique du réseau cristallin, des interférences constructives et destructives responsables du phénomène de diffraction vont se produire selon les lois de Laue et Bragg. Ainsi la diffraction d'un cristal ne peut intervenir que lorsque le vecteur de diffusion vérifie les conditions suivantes avec h, k et l des nombres entiers :

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h \ \& \ \mathbf{S} \cdot \mathbf{b} = k \ \& \ \mathbf{S} \cdot \mathbf{c} = l \quad 2.10$$

Pour un vecteur de diffusion \mathbf{S} donné, il est ainsi possible de définir une famille de plans hkl du réseau cristallin, au sein de laquelle toutes les mailles appartenant aux plans diffractent ensemble pour former une tache de diffraction. Dans ce cas le facteur total $W(\mathbf{S})$ est proportionnel au facteur de forme $F(\mathbf{S})$.

Cette condition peut être reformulée d'après les lois de Bragg, ainsi la diffraction des plans d'indices h, k, l de distances interréticulaires d_{hkl} ne se produit que lorsque l'angle 2θ entre les faisceaux incidents et diffractés satisfait l'équation :

$$|\mathbf{S}| = 2|\mathbf{s}_0| \sin\theta = \frac{2 \sin\theta}{\lambda} = \frac{1}{d_{hkl}} \quad 2.11$$

A une réflexion d'indices h, k, l correspond une résolution dans l'espace direct, mesurée par d_{hkl} , la distance entre plans réticulaires diffractants correspondants (Fig.2.1.5). Dans le cas de l'utilisation d'une source de rayons X monochromatique, à chaque faisceau diffracté correspond une seule réflexion d'indices h, k, l .

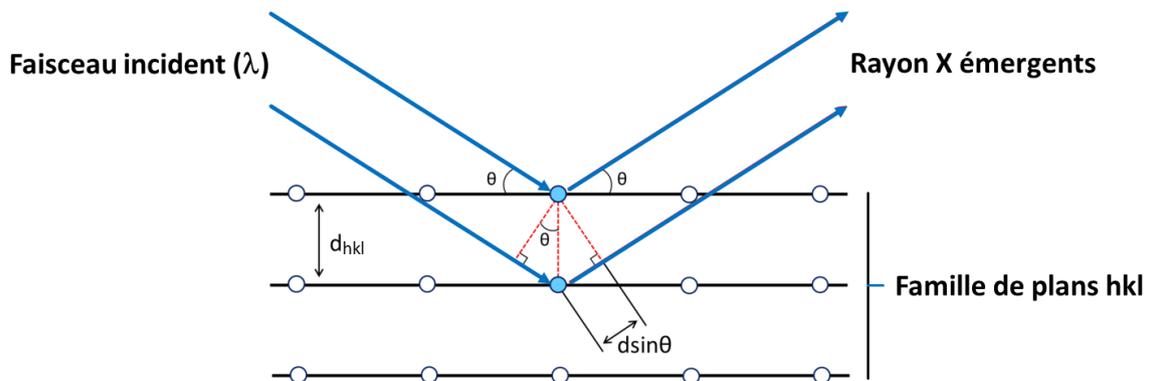


Fig.2.1.5 : Illustration de la loi de Bragg. Pour un faisceau de rayons X de longueur d'onde λ arrivant avec un θ sur les plans hkl , les rayons X émergents sont en condition de diffraction si et seulement si la distance interréticulaire d_{hkl} est égale à $2 \sin(\theta)/\lambda$.

c. Calcul de la densité électronique

L'onde totale formant la tache de diffraction indexée h,k,l étant proportionnelle au facteur de forme $F(hkl)$, l'intensité de cette tache est proportionnelle au carré de l'amplitude de $F(hkl)$. Or $F(hkl)$, initialement exprimé comme la somme des facteurs de diffusion des atomes composant la maille élémentaire, peut également être défini sous la forme de l'intégrale sur tous les électrons présents dans le volume de la maille :

$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x, y, z) \times \exp(2\pi i (hx + ky + lz)) dx dy dz \quad 2.12$$

En appliquant la transformé de Fourier sur ce facteur total de diffusion, il est alors possible d'exprimer la densité électronique en tout point de l'espace. L'apparition du phénomène de diffraction étant limité aux conditions satisfaisant la loi de Laue et Bragg, les intégrales peuvent alors être ramenées à des sommes discrètes où la densité électronique en un point x, y, z de l'espace est calculée par :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \times \exp(-2\pi i (hx + ky + lz)) \quad 2.13$$

Sachant que le facteur de forme $F(hkl)$ peut être décomposé en le produit de son amplitude et de sa phase, la densité électronique peut finalement s'exprimer par :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \times \exp(i\alpha(hkl)) \times \exp(-2\pi i (hx + ky + lz)) \quad 2.14$$

A partir de l'équation 2.6.14, il semble possible de calculer la densité électronique en tout point de l'espace, cependant la composante des phases est inaccessible à partir du cliché de diffraction. En effet, bien que $|F(hkl)|$ puisse être dérivé à partir de l'intensité de la tache hkl , le terme de phases $\alpha(hkl)$ ne peut pas être déterminé directement à partir du cliché de diffraction de la protéine native [20]. Différentes méthodes ont ainsi été développées afin d'accéder à cette information par un autre moyen afin de surmonter ce problème pour reconstituer la structure tridimensionnelle de la protéine.

d. Phasage

Les méthodes de phasages regroupent un ensemble d'approches variées permettant le calcul ou l'estimation des phases. Elles contribuent à l'obtention d'une première carte de densité électronique nécessaire à la construction d'un modèle macromoléculaire.

Les méthodes directes proposent de résoudre le problème des phases à partir des seules intensités de diffraction en exploitant les propriétés de la densité électronique qui conduisent à l'existence de relations entre les phases et les facteurs de formes.

Cependant, ces relations sont diluées lorsque le nombre d'atomes dans l'unité asymétrique augmente. Ainsi l'utilisation de ces méthodes s'adapte difficilement à la détermination des phases de macromolécules [21] dont les mailles contiennent un nombre trop élevé d'atomes pour permettre l'exploitation correcte des relations phases/intensités. De plus, il est très rare et complexe d'atteindre les hautes résolutions atomiques ($< 1,0 \text{ \AA}$) requises pour le calcul des phases par les méthodes directes. Malgré le développement récent de protocoles pour l'affinement des phases obtenues par méthodes directes [22], l'utilisation de celles-ci demeurent donc assez peu courante.

Le remplacement moléculaire (MR) consiste à extraire les données de phases à partir d'un modèle existant afin de pouvoir calculer une carte de densité électronique permettant la résolution de la protéine d'intérêt. La fiabilité de la solution obtenue par MR est largement dépendante du niveau d'homologie de séquences entre la protéine étudiée et le modèle de référence, avec une valeur minimale de 30% d'identité généralement requise pour parvenir à l'obtention d'une solution fiable de la structure.

Le processus de remplacement moléculaire [23, 24] consiste ensuite à faire correspondre la structure de référence dans l'unité asymétrique du cristal aux données expérimentales par des opérations de rotations selon trois angles, puis de translations dans les trois directions de l'espace. La solution retenue correspond aux fonctions de rotation et de translation conduisant à une meilleure corrélation entre les données calculées $|F_{hkl}|_{calc.}$ et les données observées $|F_{hkl}|_{obs.}$, en permettant la minimisation de l'écart entre les amplitudes calculées et observées. Cette méthode, dont l'utilisation nécessite seulement des données de diffraction obtenues en condition native et facilitée par les nombreuses structures de référence disponibles dans les bases de données (Protein Data Bank (PDB)), constitue la technique la plus couramment utilisée pour déterminer les structures de macromolécules biologiques [25]. Cependant, pour certaines protéines ne partageant aucune homologie suffisante avec des structures connues, ou dont les motifs de repliement n'ont pas encore été identifiés, l'utilisation de MR demeure impossible et d'autres méthodes de phasage doivent alors être envisagées. L'utilisation de méthodes alternatives pour le phasage représente environ 10% des structures résolues [26].

Les méthodes de phasage expérimentales (*de novo*) reposent sur l'introduction, au sein du cristal protéique, d'une sous-structure de référence composée d'atomes possédant un numéro atomique élevé conduisant à des différences d'intensités lors des expériences de diffractions, ensuite exploitées pour résoudre la sous-structure et ainsi initier le phasage. Ces métaux lourds peuvent être initialement présents au sein de la protéine (sélénium, zinc, fer) ou peuvent être ajoutés dans l'empilement cristallin par co-cristallisation avec la protéine ou par trempage des cristaux (or, platine, mercure, uranium) dans une solution contenant ces espèces.

Les méthodes de remplacement isomorphe : SIR et MIR

L'utilisation des méthodes SIR (Single Isomorphous Replacement) et MIR (Multiple Isomorphous Replacement) nécessite un isomorphisme parfait entre les cristaux natifs et dérivés, c'est-à-dire que l'introduction des atomes lourds ne modifie pas la structure cristalline de la protéine par rapport aux conditions natives. Dans ces conditions, les intensités des taches de diffraction du cristal natif sont comparées à celles d'un cristal dérivé. La densité électronique du cristal dérivé ρ_{PH} est alors considérée comme la somme des densités électroniques de la macromolécule seule ρ_P et celle de la sous-structure ρ_H . Cela se traduit sur les facteurs de structure par :

$$F_{PH} = F_P + F_H \quad 2.15$$

où F_{PH} est le facteur de structure du cristal dérivé, F_P celui du cristal natif et F_H celui de la sous-structure. Le remplacement multiple est similaire à la méthode précédente mais utilise un second cristal dérivé.

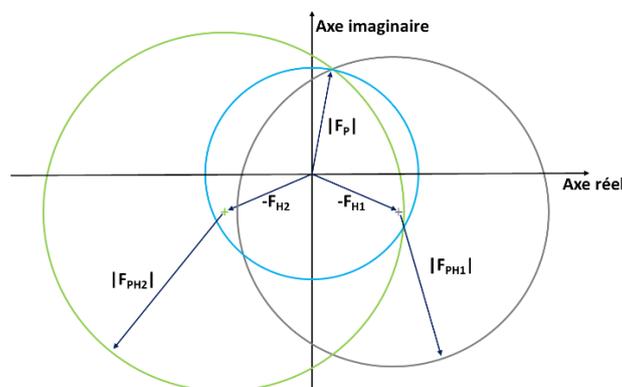


Fig.2.1.6 : Diagramme de Harker illustrant la détermination de la phase par la méthode MIR. La phase du cristal F_P est déterminé par l'intersection des trois cercles de rayons $|F_P|$, l'amplitude des signaux natifs, $|F_{H1}|$ et $|F_{H2}|$ les amplitudes des facteurs de formes des sous structures 1 et 2 d'origine respectives $-F_{H1}$ et $-F_{H2}$

Les intensités de diffraction issues du cristal natif et des deux cristaux dérivés conduisent respectivement aux modules des facteurs de structure $|F_P|$, $|F_{PH1}|$ et $|F_{PH2}|$. Les coordonnées des atomes lourds sont déterminées grâce aux différences :

$$F_{H1} = F_{PH1} - F_P \quad 2.16$$

$$F_{H2} = F_{PH2} + F_P \quad 2.17$$

permettant ensuite de calculer les amplitudes et les phases de F_{H1} et F_{H2} . La résolution des phases du cristal natif se fait alors de manière géométrique (Fig2.1.6) où F_P se situe sur un cercle de rayon $|F_P|$ d'où sont issus F_{PH1} et F_{PH2} se trouvant respectivement sur des cercles de rayons $|F_{PH1}|$ et $|F_{PH2}|$ et d'origine $-F_{H1}$ et de rayon $|F_{PH2}|$ et d'origine $-F_{H2}$. L'intersection de ces trois cercles permet ainsi de déterminer la phase de F_P .

Afin de décrire les méthodes de phasages basées sur la diffusion anormale, il est important d'introduire dans ce paragraphe les principes physiques à l'origine du phénomène de cette diffusion. Ainsi en accord avec la loi de Friedel, le pattern de diffraction d'une macromolécule est centrosymétrique ($F_{hkl} = F_{-h-k-l}$) et en absence de diffuseur anormal, le facteur de diffusion atomique est alors un nombre réel.

Lorsque des diffuseurs anomaux sont introduits au sein du cristal, la diffusion anormale intervient lorsque l'énergie des rayons X est proche du seuil d'absorbance des atomes et correspond à l'absorption de l'énergie des photons incidents par les électrons des couches profondes de l'atome anormal provoquant une excitation électronique des atomes conduisant à la réémission d'un rayonnement de même longueur d'onde que les photons incidents mais avec une phase légèrement modifiée. Le facteur de diffusion atomique f_j de l'atome lourd j est alors exprimé par le nombre complexe

$$f_j = {}^0f_j + {}^\lambda f'_j + i {}^\lambda f''_j \quad 2.18$$

avec 0f_j la composante du facteur de diffusion de l'atome lourd indépendante de la longueur d'onde, ${}^\lambda f'_j$ la composante réelle du facteur de diffusion anormal et ${}^\lambda f''_j$ la composante complexe. En conséquence, la présence des diffuseurs anomaux au sein du cristal modifie l'expression du facteur de structure total $F_{T(hkl)}$.

$$F_{T(hkl)} = F_{P(hkl)} + {}^\lambda F'_{A(hkl)} + i {}^\lambda F''_{A(hkl)} \quad 2.19$$

Avec $F_{P(hkl)}$ la contribution de la protéine, ${}^\lambda F'_{A(hkl)}$ et ${}^\lambda F''_{A(hkl)}$ les composantes réelles et imaginaires des diffuseurs anomaux [27, 28].

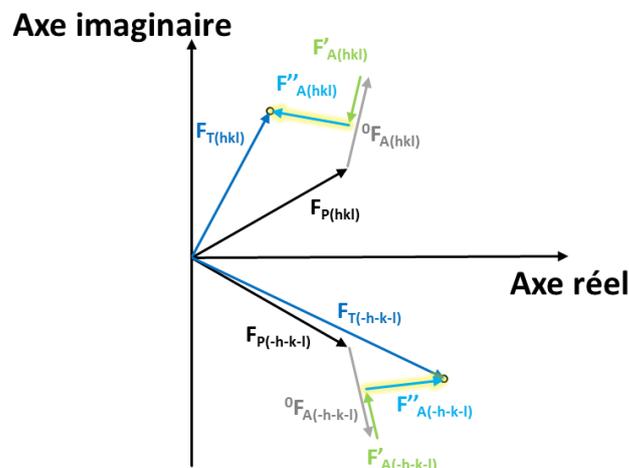


Fig.2.1.7 : Influence de l'effet anormal sur les facteurs de structure globaux pour les réflexions hkl et $-h-k-l$ d'une paire de Friedel.

La représentation graphique (Fig.2.1.7) de l'effet anomal sur les facteurs de structure globaux pour les réflexions hkl et $-h-k-l$ d'une paire de Friedel montre alors que la loi de Friedel n'est plus respectée et que $|F_{T(hkl)}| \neq |F_{T(-h-k-l)}|$. La différence des amplitudes d'une paire de Friedel est égale à la différence anormale (D_{ano}) aussi appelée différence de Bijvoet, proportionnelle à la composante imaginaire f'' du facteur de diffusion de ces atomes

$$D_{ANO} = |F_{P(hkl)}| - |F_{P(-h-k-l)}| \quad 2.20$$

et utilisée dans les expériences nécessitant l'intervention de la diffusion anormale (SAD, MAD). Pour obtenir une différence anormale importante, il est donc nécessaire de se placer à une longueur d'onde où la valeur de f'' est maximale, correspondant généralement à la valeur d'énergie du seuil d'absorption K ou L du diffuseur anormal.

Les méthodes SAD (Single-wavelength anomalous dispersion) et MAD (Multi-wavelength anomalous dispersion) constituent probablement les méthodes de phasage expérimentales les plus utilisées à l'heure actuelle. En effet, le développement de moyens tels que l'expression de protéines sélénées rend l'utilisation de cette technique relativement accessible et facilement applicable à l'étude de nombreuses macromolécules. Grâce à l'incorporation de sélénium dans les résidus contenant du soufre (méthionines et des cystéines) au sein de la séquence protéique [29], cette stratégie contribue à l'élévation du signal anomal au seuil d'absorption K pour atteindre un niveau suffisamment important permettant le phasage d'environ 75 à 100 résidus. De plus, l'apparition des dernières générations de détecteurs et de lignes de lumières [30] dont la longueur d'onde ajustable rend désormais possible l'extension de la gamme d'énergie utilisable pour la diffusion anormale, conduisant ainsi à la possibilité d'exploiter une grande variété de diffuseurs anormaux. Ainsi, le phasage direct de protéines natives peut désormais être réalisé par l'utilisation des atomes intrinsèques classiques, tels que les Chlores, les Phosphates et les Soufres initialement présents au sein de la macromolécule.

Ainsi, contrairement aux méthodes de remplacement isomorphes, ces techniques ne nécessitent l'exposition que d'un seul type de cristal contenant des diffuseurs anormaux, en permettant ainsi de s'affranchir des problèmes liés à la nécessité d'isomorphisme.

En raison du phénomène de diffusion anormale, la loi de Friedel n'est plus respectée aboutissant alors à l'obtention d'amplitudes distinctes associées aux facteurs de structures conjugués (F_{hkl} et F_{-h-k-l}), dont la différence permet de déduire la position des diffuseurs anormaux ainsi que la contribution de ceux-ci au facteur de structure total déterminé.

4. Cristallogénèse

A. Principe de la cristallogénèse

La première description de cristaux de protéines intervient en 1840 suite à la découverte accidentelle d'espèces cristallines à partir de protéines d'hémoglobine contenues dans une goutte de sang asséchée disposée entre lame et lamelle [31]. L'existence d'autres formations du même type, constituée de globulines, ont ensuite été rapportée au sein de graines de plantes [32]. Lors de la caractérisation fonctionnelle de globulines, la recherche de conditions permettant l'obtention d'un échantillon homogène conduit à l'identification de la cristallisation comme méthode de purification [33], initiant ainsi l'utilisation de cette technique en routine, tout au long du 19^{ème} et 20^{ème} siècle, dans un but purement biochimique (Fig.2.1.8). De plus, celle-ci a également constitué un outil pour établir que l'activité catalytique résidait au sein même des protéines [34, 35, 36].

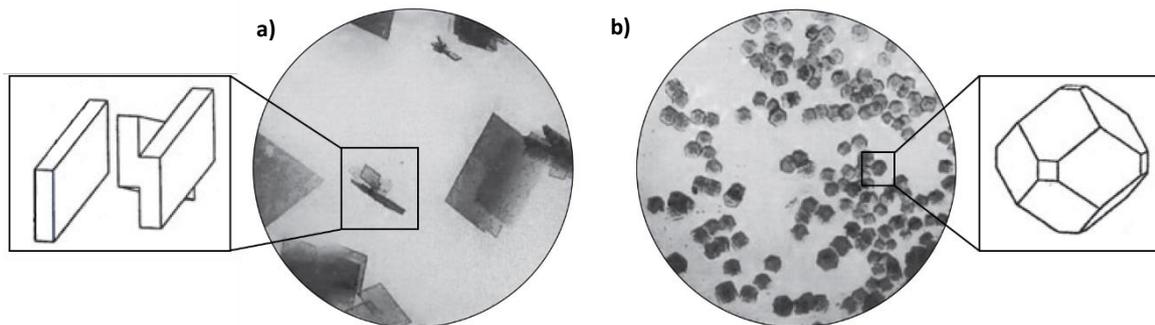


Fig.2.1.8 : Premiers cristaux d'hémoglobines cristallisés. Photographies d' α -oxyhémoglobine montrant des groupes de plaques en croissance parallèle (a) et de la β -oxyhémoglobine montrant de petits cristaux dodécaédriques (b). Les inserts représentent le schéma des cristaux soulignant leur caractère prismatique (a) et dodécaédrique (b). Reproduit d'après [37].

De nombreux protocoles vont ensuite émerger pour améliorer l'efficacité du processus [38] et des études systématiques vont être menées afin d'évaluer l'effet de différents paramètres expérimentaux tels que le pH, la température, ou la concentration en sels sur la solubilité des protéines et ainsi la cristallogénèse [39, 40, 41].

Le concept même du but ultime de la cristallogénèse a subi un changement majeur avec l'obtention en 1934 par Bernal et Hodgkin du premier cliché de diffraction issu d'un cristal de protéine [42], initiant ainsi l'ère de la biologie structurale [37] au détriment de biocristallogénèse pour la chimie et la biologie.

La cristallogénèse correspond au processus conduisant à la croissance de cristaux afin d'obtenir un arrangement périodique et ordonné de protéine. Le principe de la cristallisation consiste donc à réduire la solubilité de la protéine pour la faire passer de la phase soluble à une phase d'équilibre solide et ordonnée, à travers deux étapes essentielles : la nucléation et la croissance cristalline.

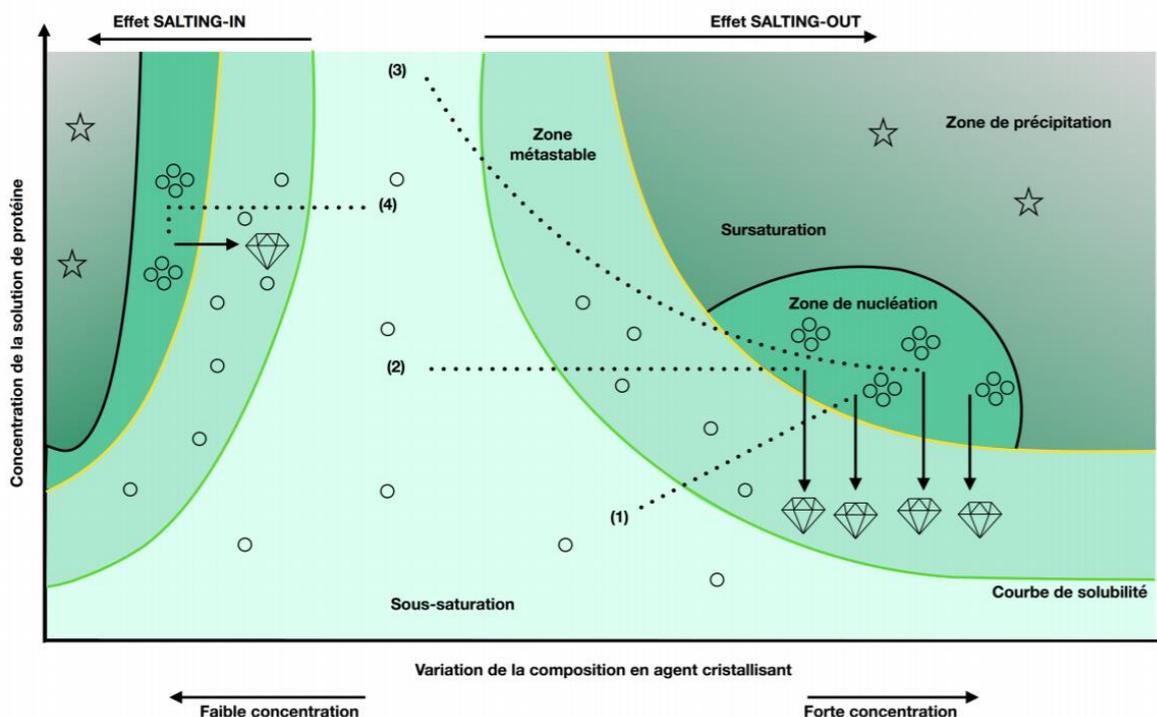


Fig.2.1.9 : Diagramme de phase illustrant les différentes phases d'une solution de macromolécules biologiques. La sursaturation est désignée par la zone au-dessus de la courbe de solubilité. Les zones de solubilité, de précipitation, correspondent respectivement aux conditions où la protéine est soluble ou précipite en solution. L'apparition de germes cristallins est initiée dans la zone de nucléation et leur croissance est poursuivie dans la zone métastable. Les tracés en pointillés représentent les différents chemins de cristallisation caractéristiques de la diffusion de vapeur (1), dialyse (2) ou contre diffusion (4). Figure issue de [43]

La nucléation consiste en l'apparition des premiers germes cristallins et peut être induite en amenant la protéine de la phase soluble vers la zone de nucléation dans laquelle les interactions spécifiques protéines/protéines sont favorisées (Fig.2.1.9).

Lors de la croissance cristalline, ces nucléi à l'origine des cristaux se développent par agrégation successive et ordonnée de protéines en respectant une symétrie propre au système macromoléculaire. Afin de comprendre et d'anticiper les mécanismes inhérents à la cristallisation, des diagrammes de phase représentant les différents états liquides et solides des macromolécules en fonction de la concentration de la protéine et du précipitant, la température et les caractéristiques du solvant (pH, force ionique, composition du tampon et présence d'additifs) [44], spécifiques à chaque macromolécule, ont été réalisés expérimentalement puis schématisés sur la base d'observations communes à toutes les protéines.

Ainsi, le diagramme de phase permet de distinguer la limite de solubilité, correspondant à la concentration maximale pour laquelle la protéine reste soluble dans un volume défini de solvant, qui sépare la zone de sous-saturation, au sein de laquelle aucun cristal ne peut croître, des zones métastable et de sursaturation, permettant l'obtention de cristaux. Au-delà de la zone de solubilité, l'étape de nucléation constitue une barrière énergétique que le système doit franchir pour initier le processus de cristallogénèse [45] nécessitant préalablement que la protéine atteigne un état de sursaturation, dont la limite est indiquée en jaune sur diagramme. Les frontières associées à ces différentes zones sont spécifiques de chaque système biologique, mais également de la composition des tampons en pH, force ionique, ainsi que la température, qui exercent également une influence significative sur la position des limites de solubilité et de sursaturation. De plus la présence de bulle ou de poussières au sein de la goutte peuvent influencer l'étape de nucléation respectivement en modifiant les concentrations locales ou en agissant en tant qu'agent de nucléation [46].

Le processus de croissance cristalline intervient à la suite de l'événement de nucléation et ne dépend pas uniquement de facteurs externes tels l'état de sursaturation ou de la présence d'impuretés mais peut également être modulée par des facteurs internes tels que la structure du germe cristallin ainsi que de l'établissement d'interactions inter-protéiques [47] impliquées dans la mise en place de la maille cristalline et influençant ainsi directement la morphologie du cristal. La cohésion de ces contacts au sein du cristal est déterminante pour la qualité de diffraction, il apparaît ainsi nécessaire de maîtriser la vitesse de croissance des cristaux afin de favoriser les interactions protéines-protéines et limiter l'apparition de défauts d'empilement induits par une croissance trop rapide [48].

L'obtention de cristaux est donc conditionnée par la détermination de conditions physico-chimiques permettant d'atteindre la zone sursaturée du diagramme de phase favorisant l'apparition de germes puis de cristaux de protéines exploitables pour la diffraction des rayons X. Cependant, le diagramme de phase étant unique pour chacune des conditions de cristallogénèse, il est difficile de déterminer à l'avance les concentrations en protéine et en précipitant favorables à la cristallisation, et l'optimisation des conditions de cristallisation est réalisée de manière empirique en criblant un grand nombre de conditions par différentes approches détaillées ci-dessous

B. Les différentes méthodes de cristallisation

Une large gamme de méthodes a été développée afin d'amener la protéine au sein de la zone de nucléation du diagramme de phase, telle la cristallisation par diffusion de phase vapeur, en batch, dialyse ou contre-diffusion. Lors de ce projet seules les techniques de cristallisation par phase vapeur et en phase cubique lipidique ont été directement utilisées et sont détaillées dans ce paragraphe.

a. Diffusion de vapeur

La cristallisation par diffusion de vapeur constitue la technique la plus répandue et consiste à placer, dans un environnement hermétiquement clos, une goutte de solution protéique mélangée à une goutte de précipitant en suspension au-dessus d'un réservoir contenant un grand volume de

précipitant. Les conditions initiales de protéines et de précipitant dans la goutte correspondent à la zone de solubilité. Du fait du mélange avec la protéine, la concentration en précipitant dans la goutte est réduite de moitié par rapport à celle du puits. Celles-ci vont alors s'équilibrer par diffusion de vapeur de la goutte vers le réservoir, provoquant une diminution du volume de la goutte et entraînant ainsi une augmentation des concentration en protéine et en précipitant (Fig.2.1.10.a). Ceci permet d'atteindre la zone de nucléation où la formation de germes cristallin (nucléation) est thermodynamiquement favorable. La croissance se poursuit ensuite dans la zone métastable, en consommant la protéine jusqu'à atteindre la courbe de solubilité (Fig.2.1.9-(1)).

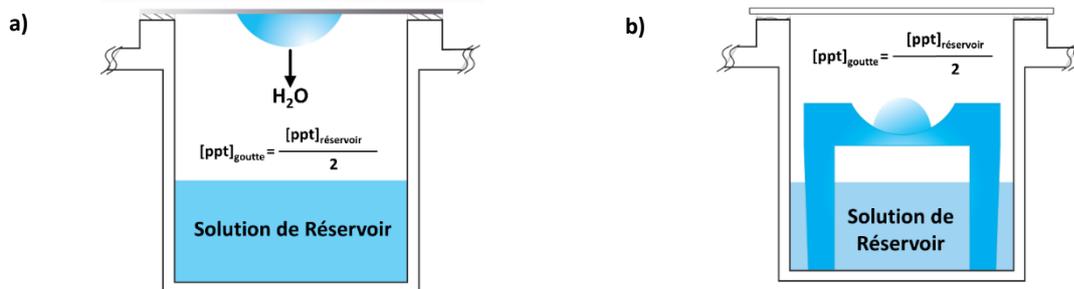


Fig.2.1.10 : Schéma du dispositif expérimental permettant la cristallisation par diffusion de vapeur. Principe de la technique de la goutte suspendue (a) et de la goutte assise (b) Figure issue de [49].

Une autre configuration, consistant à placer la goutte de cristallisation assise sur un support présent dans le puits, permet également la croissance selon le principe de la diffusion de vapeur (Fig.2.10.b).

b. Phase Cubique Lipidique

Une autre méthode pour la cristallisation des protéines membranaires repose sur la cristallisation en phase cubique [50], consistant à introduire la protéine dans une mésophase constituée d'un mélange d'eau et de lipides formant une unique bicouche lipidique organisée en réseau de canaux périodiques. Dans ces conditions, les protéines sont proches d'un environnement membranaire leur permettant de diffuser librement pour faire des arrangements permettant la formation de cristaux [51]. De plus, au sein de cette mésophase les protéines peuvent établir des contacts entre leurs domaines hydrophobes, permettant ainsi de réduire la quantité de solvant et d'améliorer la qualité du cristal.

C. Recherche des conditions de cristallisation

Par rapport à la faible quantité d'échantillon protéique pure et homogène généralement disponible, l'ensemble des paramètres physico-chimiques influençant la cristallisation des macromolécules biologiques représente un espace relativement vaste, et complexifie ainsi la cristallogénèse. A ce jour, aucune base théorique ne permet de prédire les conditions optimales permettant d'obtenir des cristaux et le succès de la cristallisation des protéines reposent donc uniquement sur les méthodes criblant le plus grand nombre de paramètres. Une fois des conditions de cristallisation identifiées, une étape importante d'optimisation reste nécessaire afin d'obtenir des cristaux atteignant la plus haute qualité de diffraction des rayons X.

a. Criblage

En considérant l'ensemble des conditions connues ou publiées comme favorisant la cristallisation de protéines, différents kits commerciaux de criblages standards ont été élaborés, permettant d'identifier rapidement des conditions pouvant aboutir à la cristallisation de la protéine [52]. Ces matrices de criblage regroupent un grand nombre de conditions, dont les paramètres ayant une forte influence sur la cristallisation tels que le pH et la nature du tampon, la longueur de chaîne du précipitant, la nature et la concentration des sels, sont variables. Au cours des années, les matrices de criblages ont été diversifiées, incluant de nouvelles conditions identifiées, et un large choix est désormais disponible avec des kits spécifiquement adaptés au type de macromolécule à cristalliser [53]. Ainsi, des matrices

de criblages ont également été spécifiquement dédiées aux protéines membranaires (MemGold1&2, MemMeso, MemStart & MemSys).

Au cours de ce travail de thèse, l'étape de criblage a été automatisée sur des plaques 96 puits à la plateforme HTX de l'EMBL.

Bien que l'évaluation du résultat de chaque condition testée puisse être résumée à la simple croissance ou absence de cristaux, une analyse croisée plus fine reposant sur l'attribution de score est nécessaire afin d'extraire un grand nombre d'informations précieuses concernant les paramètres favorables à la cristallo-genèse et permet ainsi de prédire l'influence des différents paramètres physico-chimique sur la cristallisation (Fig2.1.13). De plus, en absence de cristaux sur l'ensemble des conditions testées, l'observation de l'évolution des gouttes de protéines peut néanmoins fournir des indices concrets sur les pistes à suivre et ajuster afin d'aboutir à la réussite de la cristallo-genèse. Les conditions testées durant l'étape de criblage ont été annotées par observation de la goutte à intervalles réguliers et évaluées grâce à une échelle de scores [54].

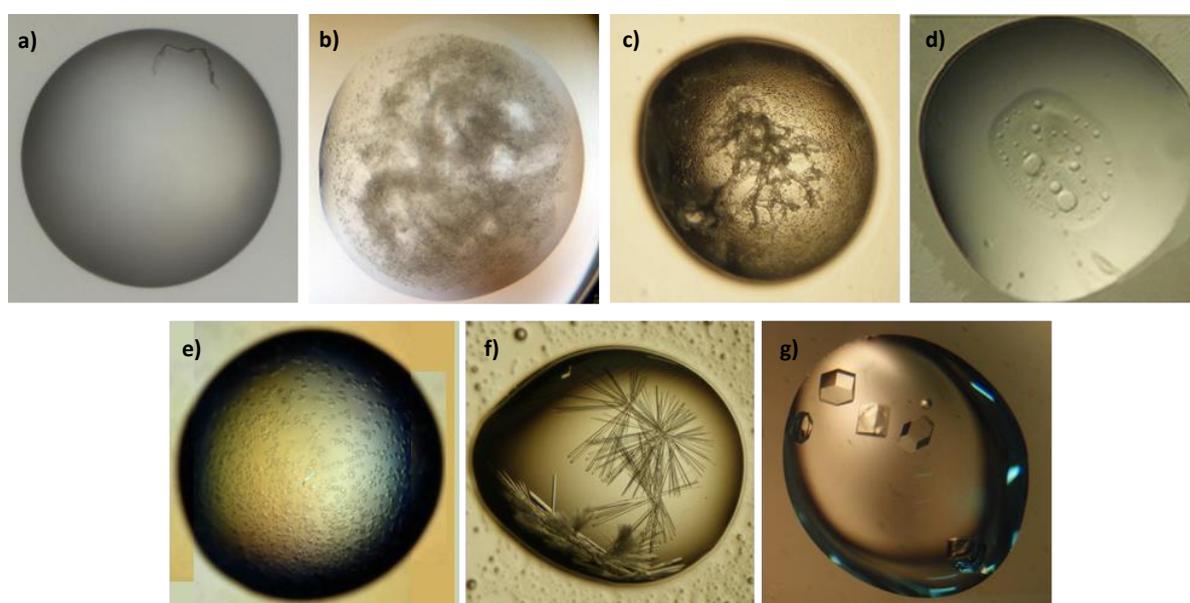


Fig.2.1.13 : Représentation d'allures typiques de gouttes de cristallisation permettant l'évaluation à travers l'attribution de scores (a) Goutte claire, score : 0 ; (b) Précipité, score : 1 ; (c) Dénaturation, score : 2 ; (d) Séparation de phase, score : 3 ; (e) μ cristaux, score : 4 ; (f) Cluster d'aiguilles, score : 5 ; (g) Macrocristaux, score 6. Images de goutte tirées de [54].

b. Optimisation

Durant l'étape de criblage, les premiers cristaux ou microcristaux d'origine protéique identifiés présentent généralement un faible pouvoir de diffraction des rayons X. Une étape d'optimisation peut ainsi souvent être réalisée afin de réduire la nucléation et la vitesse de croissance pour aboutir à des structures mieux organisées au sein de cristaux plus gros, présentant de meilleurs contacts cristallins conduisant à une qualité de diffraction des rayons X supérieure. Par rapport au diagramme de phase, l'objectif de l'optimisation est donc de limiter au maximum le chemin parcouru par la goutte au sein de la zone de nucléation au profit du temps passé dans la zone de croissance. Dans ce but, de nombreuses stratégies ont été développées, dont certaines sont détaillées ci-dessous.

1. Le scale up

La méthode du scale up consiste à tester des variations fines autour des conditions ayant conduit à des cristaux. Dans un premier temps, les modifications sont réalisées en variant indépendamment selon chaque dimension de la matrice un seul paramètre parmi la concentration en sels, en précipitant et en protéine (Fig.2.1.14). Enfin les paramètres généraux tels que la température et le pH peuvent également être ajustés lors de l'étape de criblage.

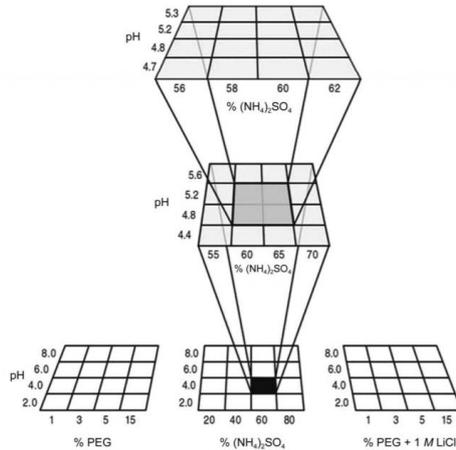


Fig.2.1.14 : Processus de scale up pour l'optimisation de la cristallo-genèse des protéines. Le scale up consiste en une série d'affinements successifs se resserrant progressivement autour d'une condition spécifique à l'aide de gammes de plus en plus étroites faisant varier les paramètres principaux influant sur la cristallo-genèse.

Cependant, les combinaisons explorables étant infinies, l'amélioration de la condition de cristallisation initiale ne suit pas un chemin linéaire. De plus, l'effet d'un paramètre pouvant être couplé avec la variation d'un autre, cela complexifie encore ce processus d'optimisation [55, 56]. Il est ainsi nécessaire d'identifier les principaux facteurs influençant la cristallisation afin de se recentrer autour d'un nombre restreint de conditions sur lesquelles réaliser les rounds d'affinements successifs.

2. Variation du ratio protéine/puits

La variation du ratio protéine/puits peut aussi être réalisée afin de modifier le chemin d'évaporation de la goutte dans le diagramme de phase et réduire la nucléation au profit de la phase de croissance. Ce type de modification permet de moduler facilement les concentrations initiales et finales en protéine ainsi que la concentration initiale de précipitant mais la concentration en précipitant une fois l'équilibre atteint n'est pas modifiée.

L'influence de la variations de ratio protéine/puits peut être visualisée pour les rapports 1:1, 2:3 et 3:2 en représentant sur le diagramme de phase (Fig.2.1.15) la position respective des concentrations initiales et finales en protéine ainsi que les différents chemins d'équilibration explorés en fonction des ratio. Ainsi, une faible variation de ratio protéine/puits au sein de la goutte est suffisante pour produire des expériences différentes permettant d'explorer et d'évaluer différentes concentrations de protéines et de réactifs, ainsi que des trajectoires et taux d'équilibration uniques pouvant influencer la taille, le nombre, la morphologie et la qualité des cristaux.

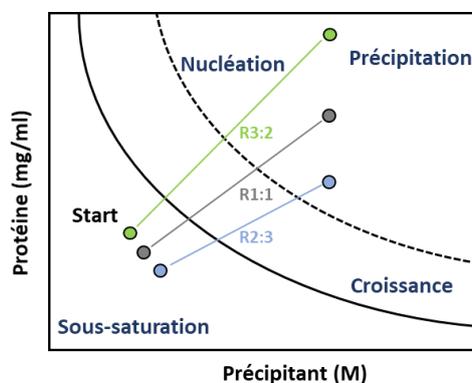


Fig.2.1.15 : Effet de la variation de ratio protéine/solution de précipitations sur les concentrations initiales de protéine et détergent et sur la concentration finale de protéine au sein des gouttes de cristallisation. Un ratio protéine:solution de puits de 3:2 réduit artificiellement la concentration de précipitant et augmente les concentrations initiales et finales de protéine. A l'inverse, un ratio 2:3 augmente la concentration de précipitant et abaisse les concentrations initiales et finales de protéine.

3. L'ensemencement

Les niveaux élevés de sursaturation sont thermodynamiquement favorables à la nucléation des nucleus cristallins de protéines, en revanche, la croissance lente et ordonnée de gros cristaux nécessite des niveaux plus faibles de sursaturation. Une expérience de cristallisation idéale nécessiterait donc de pouvoir découpler ces deux évènements. L'ensemencement (seeding) est une méthode expérimentale visant à découpler la nucléation et la croissance grâce à l'introduction de fragments de cristaux préexistants, généralement obtenus à des taux de sursaturation élevés, dans de nouvelles gouttes équilibrées à des niveaux plus faibles de sursaturation (Fig.2.1.16), par exemple réalisées en diminuant la concentration de protéines ou de précipitant dans la solution de puits par rapport à la condition d'obtention des graines d'ensemencement [57].

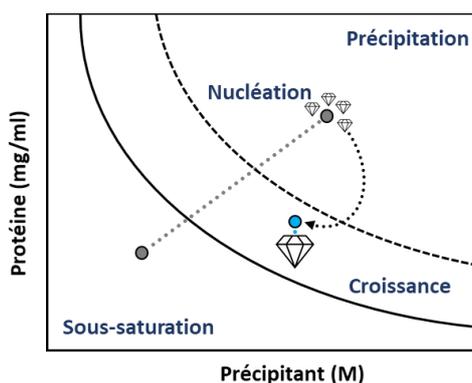


Fig.2.1.16 : Principe d'ensemencement de germes cristallins permettant la croissance cristalline. Des germes sont obtenus en plaçant dans une condition de sursaturation élevée puis transfert dans la zone métastable pour poursuivre la croissance cristalline en absence de nucléation spontanée.

Deux types d'ensemencement peuvent être distingués en fonction des graines cristallines utilisées pour la phase de croissance. Le macro-ensemencement consiste à transférer un cristal entier dont la croissance n'est pas terminée, dans une nouvelle goutte plus faiblement sursaturée dans le but de poursuivre et d'améliorer la croissance cristalline tandis que le micro-ensemencement repose sur l'utilisation de graines cristallines submicroscopiques (Fig.2.1.7.c) obtenues en fragmentant les cristaux issus de la phase de nucléation à l'aide de billes de céramiques (Fig.2.1.17).

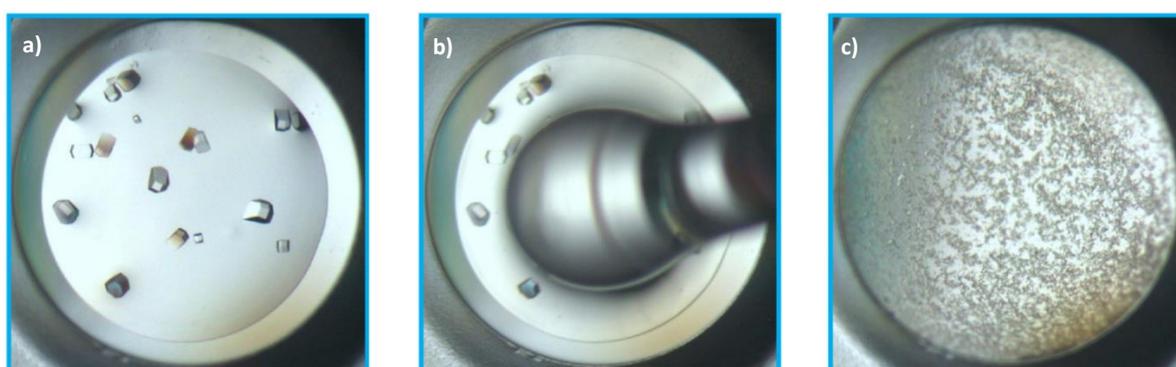


Fig.2.1.17 : Processus d'obtention des germes cristallins à partir de macrocristaux. (a) Macrocristaux obtenus en conditions sursaturante. (b) Fragmentation des cristaux à l'aide d'outils spécifiques. (c) Germes cristallins.

Les graines peuvent ensuite être ensemencées dans de nouvelles conditions de cristallisation simplement par mélange ou dispensées selon une ligne à l'aide d'un outil flexible (streak seeding). L'utilisation de l'ensemencement est particulièrement adaptée pour obtenir des cristaux plus grands ainsi qu'un taux de cristallisation plus élevé. De plus, cette technique permet également l'optimisation de la qualité de diffraction [57].

Afin de faciliter l'obtention de cristaux, notamment en absence de hit¹ identifié par la méthode classique, un ensemencement croisé peut être réalisé en utilisant des graines initiales provenant d'une protéine structurellement proche de la protéine d'intérêt.

Enfin le processus d'ensemencement peut également être réalisé en série, c'est-à-dire que des cristaux issus d'un premier ensemencement peuvent à leur tour être broyés et utilisés pour la réalisation de nouvelles gouttes de cristallisation. Il a été montré que l'enchaînement de ces étapes successives peut permettre d'améliorer la qualité des cristaux à chacune des étapes [57].

4. Stratégies de stabilisation de la protéine

L'homogénéité de l'échantillon protéique étant un paramètre essentiel pour la cristallogénèse, l'introduction de mutations ponctuelles stabilisantes au sein de la protéine peut permettre, en plus d'une augmentation de la thermostabilité de l'échantillon limitant la formation d'agrégats, de fixer toutes les protéines dans un même état conformationnel favorisant ainsi l'homogénéité. Cette approche repose notamment sur la substitution de groupements de deux à trois acides aminés présentant une forte entropie de conformation (glutamate, lysine) par des résidus plus stables du point de vue énergétique (alanine). L'ajout de tyrosines et de thréonines peut également être envisagé afin de favoriser les contacts cristallins [58]. Le développement de serveurs dédiés à l'analyse des séquences protéiques et à la prédiction de mutations stabilisantes [59] facilite ce processus en suggérant des positions stratégiques ainsi que la nature des substitutions à réaliser.

Cependant, cette approche nécessitant la mutation de la construction initiale de la protéine, toutes les étapes à partir du clonage jusqu'à l'expression et la purification doivent être à nouveau adaptées, et cette technique représente donc généralement un investissement non négligeable en termes de temps à consacrer pour la réalisation de telles modifications. De plus, il est également nécessaire de s'assurer que les mutations introduites n'induisent pas de modifications trop drastiques de la structure ou ne se trouvent pas à des positions cruciales, où le changement d'acide aminé pourrait impacter le repliement correct de la protéine.

5. Contrôle de la température

A température constante, la croissance des cristaux se déroule en consommant de la protéine jusqu'à atteindre la limite de solubilité. Au cours de la cristallogénèse, la réduction de la température une fois l'équilibre atteint permet de déplacer la goutte dans un état hors-équilibre pour continuer la croissance des cristaux [60]. La répétition de nombreux cycles de croissance/réduction de la température permet ainsi de s'affranchir des limites de croissance imposées par l'état physico-chimique de la goutte et ainsi de développer lentement de gros cristaux présentant une qualité de contacts cristallins optimale (Fig.2.1.18).

¹ Le terme « hit » utilisé spécifiquement pour les expériences de cristallogénèse, désigne un résultat positif.

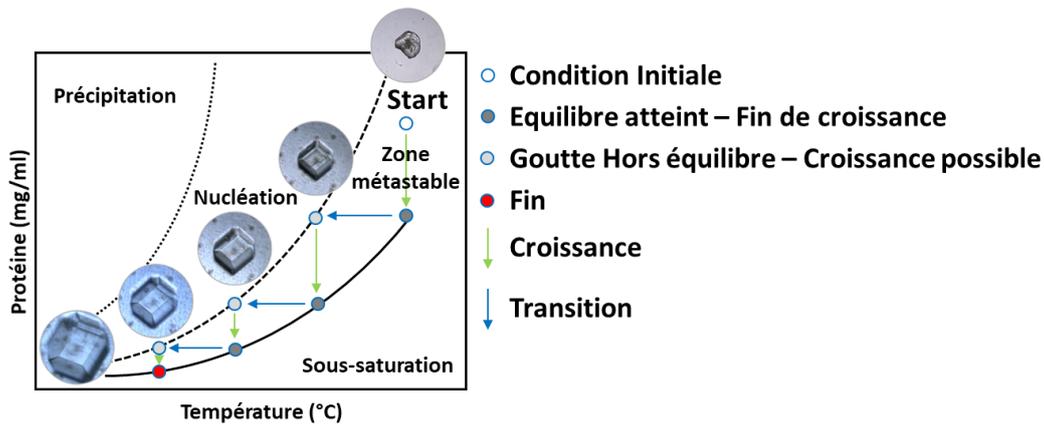


Fig.2.1.18 : Contrôle de la croissance cristalline grâce à la régulation de la température au cours du processus de cristallo-genèse. A partir de la condition initiale, le cristal se développe en traversant la zone métastable (flèche verticale). Une fois à l'équilibre atteint au niveau de la zone de solubilité, la température est réduite (flèche horizontale) pour sortir le cristal de l'équilibre et poursuivre la croissance. Ce cycle peut être répété jusqu'à l'obtention de gros cristaux.

c. Difficultés liées aux protéines membranaires

1. La protéine en tant que variable

La présence d'impuretés en solution pouvant perturber les contacts cristallins et empêcher la cristallo-genèse, la cristallisation constituait initialement un simple moyen permettant d'accéder à des échantillons biologiques extrêmement purs. Ainsi, en plus de la composition de la solution de cristallisation, la pureté de la protéine exerce une influence majeure sur la cristallisation et il apparaît ainsi primordial d'optimiser au mieux le processus de purification en amont de tout essai de cristallo-genèse. La concentration de la protéine constitue également un paramètre affectant largement le diagramme de phase [61]. En effet, pour des conditions de cristallisation identiques, alors qu'une concentration trop faible en protéine ne permet pas d'atteindre la zone de nucléation, une concentration trop élevée conduit systématiquement à la précipitation de l'échantillon. Il est donc essentiel d'établir de manière précise et reproductible la concentration initiale en protéine à privilégier pour le succès de la cristallo-genèse.

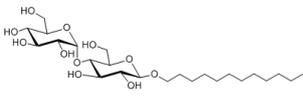
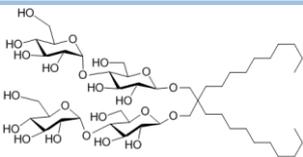
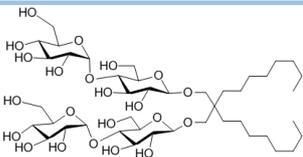
2. Les détergents

Les protéines membranaires constituent, à travers les membranes imperméables, un moyen d'échange entre le milieu intracellulaire et l'environnement extérieur, et exercent ainsi un rôle essentiel pour la cellule. Cependant, les parties hydrophobes permettant l'enclassement de celles-ci au sein des membranes représentent également l'obstacle principal à leur étude et leur manipulation et nécessite ainsi le développement de stratégies spécifiques [62].

La caractérisation structurale et fonctionnelle des protéines membranaires intégrales nécessite l'extraction préalable de celles-ci en dehors de la membrane, impliquant la rupture des interactions hydrophobes entre les protéines d'intérêt et le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique [63]. Cependant, hors d'un environnement lipidique, les protéines membranaires s'agrègent en raison de l'effet hydrophobe, et il est ainsi nécessaire d'éviter la formation d'agrégats en les isolant de l'environnement aqueux à l'aide de molécules amphiphiles de détergents, permettant le maintien de l'intégrité structurale de protéines membranaires tout en déstabilisant la bicouche lipidique.

De manière similaire aux lipides, les détergents sont des molécules amphiphiles. Chaque détergent est caractérisé par une concentration micellaire critique (CMC) à partir de laquelle l'ajout de nouvelles molécules de détergent provoque l'autoassemblage spontané des monomères en micelles globulaires. Au contact d'une membrane biologique, les monomères de détergent s'insèrent progressivement dans la bicouche, déstabilisant ainsi les interactions entre lipides au sein de celle-ci et aboutissant finalement à la solubilisation de la membrane qui s'accompagne de la formation dans la solution de

micelles mixtes détergents/lipides et détergents/lipides/protéine dans lesquelles le détergent forme un assemblage isolant du solvant les parties hydrophobes de la protéine permettant ainsi, en présence de détergent au-dessus de la CMC, le maintien des protéines membranaires en solution et la manipulation et l'étude de celles-ci comme des protéines solubles [64]. De nombreuses caractéristiques telles que la taille de la tête et de la queue ou la charge du détergent influencent la solubilité et le maintien des protéines membranaires en solution. Ainsi, le choix du détergent constitue un élément essentiel afin de trouver un compromis entre l'optimisation de la solubilisation et la stabilité afin de préserver la protéine des risques de perturbation ou dénaturation liée à l'utilisation de telles molécules. De plus la taille des micelles formées par le détergent constitue également un critère essentiel pour la cristallisation des protéines membranaires. En effet, bien que plus stabilisante pour la protéine, une micelle de taille supérieure pourrait empêcher l'établissement des contacts cristallins [65].

	DDM	LMNG	DMNG
Caractéristique dans H₂O (Anatrace)			
Formule Chimique	C ₂₄ H ₄₆ O ₁₁	C ₄₇ H ₈₈ O ₂₂	C ₄₃ H ₈₀ O ₂₂
Masse molaire (g/mol)	510.6	1005.19	949.08
CMC	0.17 mM (0.0087%)	0.01 mM (0.001%)	0.036mM (0.0034%)
Nombre Agrégation	78 - 149	45 – 227	x
Taille micelle	72kDa	Augmente jusqu'à 10mg/ml	x
Incrément d'indice de réfraction dn/dc (mL/gm)	0.1435	0.146	x

Tab.2.1.1 : Caractéristiques des principaux détergents utilisés. Les x indiquent que les valeurs n'ont pas été référencées dans la bibliographie.

5. Le traitement des données

A. Les principes

Le protocole de traitement des données collectées lors de l'exposition du cristal comporte trois étapes majeures.

L'indexation. Ce processus consiste à déterminer l'orientation du cristal et ses paramètres de maille en utilisant la position des taches de diffraction couplée à l'angle d'oscillation. Les processus d'indexation cherchent trois vecteurs de base permettant de relier toutes les réflexions, puis la matrice d'orientation ainsi que la maille expliquant toutes les réflexions observées. Il est alors possible de prédire la position de l'ensemble des taches de diffraction sur les images et d'en mesurer l'intensité.

L'intégration des intensités. La largeur et la divergence du faisceau incident ainsi que la mosaïcité des cristaux conduit à la dispersion spatiale des raies de diffraction et donc à un étalement de la tache de

diffraction. Les programmes de traitement permettent d'établir les profils et d'extraire l'intensité de chaque réflexion par intégration numérique des taches enregistrées.

La mise à l'échelle. L'intensité des taches de diffraction est théoriquement constante par symétrie, mais en raison de la forme du cristal, de la dégradation des cristaux exposés au faisceau de rayons X, et des variations d'intensité du faisceau, les mesures d'intensité réalisées à des temps et des orientations différentes présentent des différences. Il est donc nécessaire de remettre à l'échelle l'ensemble des intensités de réflexions en utilisant, pour chaque cliché, des facteurs de normalisation calculés à partir des taches supposées équivalentes par les symétries du cristal. Enfin les intensités des réflexions équivalentes sont moyennées et le module des facteurs de structure est calculé permettant d'obtenir l'ensemble des réflexions uniques nécessaires pour calculer l'image de la densité électronique par transformée de Fourier.

B. Les programmes utilisés

Un ensemble de programmes dédiés au traitement des images de diffraction permet la mesure des intensités de chaque réflexion, leur mise à l'échelle et la détermination des facteurs de structures. Différents programmes ont été utilisés pour traiter les jeux de données enregistrés sur les cristaux obtenus lors de cette étude : XDS [66] pour l'indexation et l'intégration des taches de diffraction et la suite CCP4 [67] pour la réduction des données.

XDS. Ce programme développé par [66] se décompose en sept sous-programmes permettant un traitement des données automatisé et rapide par découplage des différentes opérations. Il permet notamment de déterminer des profils tridimensionnels indispensables pour les cristaux présentant une forte mosaïcité et pour lesquels l'intensité d'une tache peut être répartie sur plusieurs images.

Staraniso. Ce programme permet l'application d'un masque en accord avec l'anisotropie des cristaux afin d'obtenir les informations la meilleure résolution selon chacune des directions des paramètres de maille.

La suite CCP4 : cette suite de programmes dispose d'un ensemble de scripts pour la manipulation des fichiers informatiques contenant les réflexions mesurées ainsi que la mise à l'échelle et le calcul des modules des facteurs de structure puis l'affinement (REFMAC5).

Coot. Ce programme est utilisé pour la reconstruction du modèle tridimensionnel à partir des cartes de densité électroniques calculées.

C. La validation des données

La qualité des jeux de données est ensuite évaluée par différents critères statistiques calculés au cours du traitement dont les plus courants sont détaillés ci-dessous.

La résolution. Ce paramètre détermine la plus faible distance entre deux points distinguables l'image de la densité électronique. La qualité de diffraction des cristaux est le principal facteur limitant la résolution des données mesurées mais d'autres facteurs expérimentaux tels que la taille du détecteur, la distance cristal-détecteur ou la longueur d'onde peuvent impacter la limite de résolution.

Le signal sur bruit (I/σ) moyen. Une valeur élevée de ce paramètre témoigne d'une forte intensité des taches par rapport au bruit de fond et permet d'améliorer la détermination des facteurs de formes.

La complétude. La complétude, déterminée par le rapport entre le nombre de réflexions uniques expérimentalement observées et le nombre théorique de réflexions attendues, doit être supérieure, dans le cas classique avec une protéine soluble, à 90% pour que les données soient considérées

bonnes. Cependant l'évolution des outils d'analyse peut permettre de résoudre des cas complexes ou la complétude n'atteint pas des niveaux aussi élevés dans toutes les couches de résolution.

La redondance. La redondance correspond au nombre moyen de réflexions symétriques mesurées. Une valeur élevée de ce paramètre permet de diminuer les erreurs de mesure d'intensité.

6. Affinement et construction de la structure

Les facteurs de structure calculés à partir du modèle présentent généralement des désaccords avec les facteurs déterminés à partir des clichés de diffraction des rayons X. Un affinement de la solution est donc nécessaire afin d'améliorer la correspondance entre les facteurs de structures simulées et expérimentaux par des méthodes manuelles de manipulation des modèles atomiques et des cartes de densité électronique et par des techniques d'affinements numériques permettant de compenser les erreurs induites par la reconstruction manuelle.

D. Les programmes utilisés

Refmac5. Ce programme disponible avec la suite de programmes CCP4 a spécialement été développé pour affiner les structures par les méthodes de minimisation. Ce programme suit une procédure séquentielle : à partir des coordonnées atomiques du modèle, les contraintes géométriques sont déterminées et les modules et phases des facteurs de structure calculés et mis à l'échelle par rapport aux facteurs de structure observés. L'étape d'affinement, selon la méthode des moindres carrés ou de maximum de vraisemblance, est ensuite réalisé en minimisant la fonction choisie par la méthode du gradient conjugué : dans l'espace des paramètres affinés, le minimum de la fonction est atteint en faisant varier les valeurs des paramètres pour se déplacer dans la direction opposée au gradient de cette fonction. Plusieurs cycles sont nécessaires afin d'atteindre un minimum local. L'affinement de la structure peut être effectué en corps rigides ou en affinant l'ensemble des coordonnées avec ou sans le facteur d'agitation de chaque atome. A la fin de cette procédure, les nouvelles coordonnées du modèle affiné sont calculées et ses facteurs de structures associés.

E. Cartes de densité électronique

Le modèle généré en cours d'affinement présente des désaccords de phase avec les phases de la structure cristalline. En raison de la prédominance du terme de phase dans la densité électronique, ce désaccord de phase biaise largement le rendu de la densité électronique du modèle. Pour suivre l'évolution des différences entre le modèle et l'image de la densité électronique pendant le processus d'affinement et guider l'affinement manuel, deux types de cartes de densité électronique, dites "cartes de différences", sont calculées.

La carte $2F_{obs}-F_{calc}$ ($2Fo-Fc$). Elle peut être considérée comme la densité électronique de la molécule à résoudre.

La carte $F_{obs}-F_{calc}$ ($Fo-Fc$). Elle constitue la carte de densité résiduelle qui permet de mettre en évidence les différences entre la densité du modèle et celle observée. Elle permet aussi d'identifier des erreurs grossières sur la position des atomes ou encore la présence d'atomes manquants dans le modèle. Pour visualiser et manipuler ces cartes de densités électroniques, ainsi que les modèles moléculaires, le logiciel Coot a principalement été utilisé [68].

F. Critères d'évaluation du modèle

Différents critères permettent l'évaluation de la qualité du modèle affiné.

Le facteur R. Il évalue la qualité du modèle en mesurant l'accord entre les facteurs de structure observés et les facteurs de structure calculés. Les méthodes d'affinement tentent de minimiser au maximum ce facteur mais il peut arriver que les erreurs du modèle compensent les erreurs des mesures conduisant à une valeur erronée du facteur R.

Une estimation moins biaisée de la qualité du modèle peut être définie par le facteur R_{free} correspondant au facteur R calculé sur un ensemble de réflexions aléatoires (2 à 10 %, généralement fixé à 5%) non incluses dans l'affinement [69]. Ce facteur, fortement corrélé à la précision des phases, permet de détecter de multiples types d'erreurs dans la structure. Il peut aussi être utilisé pour la détermination de certains paramètres de l'affinement comme l'optimisation du poids des données expérimentales par rapport aux contraintes stéréochimiques.

Le ratio $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ est un moyen de qualifier l'état de surdétermination du système et donc de la résolution maximale des données. Ainsi dans le cas d'un suraffinement du modèle lorsque le nombre d'observations n'est pas suffisant, le R_{free} aura tendance à augmenter pendant que le facteur R diminue [70]. De plus, plus le rapport entre le nombre d'observations et le nombre de paramètres à affiner est faible, plus cet écart est important [71].

Rmsd (Root mean square deviation). Les déviations moyennes des longueurs et angles de liaisons entre atomes du modèle estiment la qualité stéréochimique de celui-ci. Cette qualité est considérée comme satisfaisante lorsque ses déviations ne sont pas supérieures aux variations physiques des longueurs et des angles de liaison déjà observées pour les petites molécules (environ 0.02 Å pour les longueurs et 2° pour les angles) [72].

Le diagramme de Ramachandran. Il permet lui aussi de juger la qualité stéréochimique du modèle affiné [73]. En raison de l'encombrement stérique des chaînes latérales des aminoacides, les liaisons peptidiques ne peuvent adopter qu'un certain nombre limité de conformations. Pour chaque résidu, ces conformations sont caractérisées par les angles Φ et Ψ de la liaison peptidique et sont représentées sur un graphique. Ce diagramme de Ramachandran permet ainsi la représentation des régions énergétiquement favorables, des régions permises ainsi que celles non autorisées. Les chaînes latérales sont elles aussi soumises à des conformations énergétiquement favorables, appelées rotamères, qui seront fortement représentées parmi les différentes conformations rencontrées dans les structures de protéines et dont la stéréochimie est vérifiée à l'aide d'un type de diagramme similaire.

Enfin les paramètres incorrects, tels que les contacts atomiques, la longueur et l'angle des éventuelles liaisons hydrogènes sont aussi à vérifier pour l'identification des régions potentiellement erronées du modèle.

7. Diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)

Contrairement à la cristallographie aux rayons X la caractérisation par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) constitue une approche basse résolution permettant de modéliser une enveloppe globale de la protéine [74] et d'extraire des paramètres de forme généraux tels que le rayon de giration ou l'état d'oligomérisation. De plus, cette méthode ne nécessitant pas la cristallisation de la protéine étudiée, de nombreuses informations relatives à la protéine en solution, plus proche de l'état physiologique, peuvent être extraites.

A. Principe

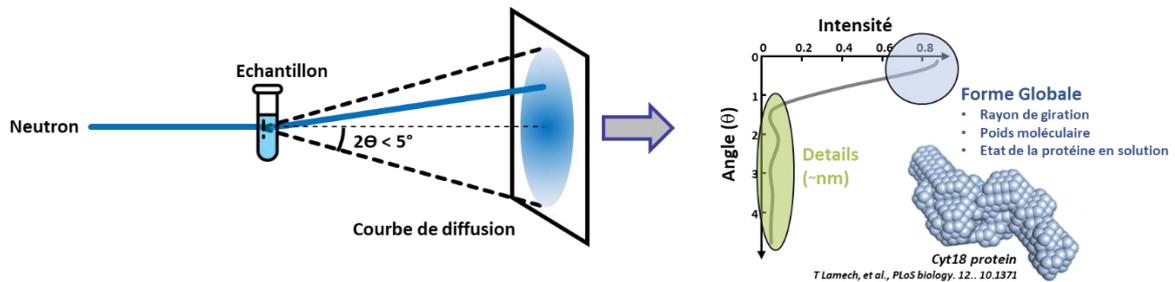


Fig.2.1.19 : Principe de la diffusion des neutrons aux petits angles. La diffusion d'un faisceau de neutrons conduit à une courbe d'intensité en fonction du vecteur de diffusion permettant d'extraire les paramètres de formes généraux de la protéine et de produire une enveloppe globale de cette dernière.

Les expériences de SANS reposent sur la diffusion d'un rayonnement collimaté de neutrons, à de petits angles de diffusion pour étudier les paramètres structuraux globaux et la forme des protéines. Alors que les rayons X interagissent avec le nuage électronique des atomes [75], conduisant ainsi à une diffusion optimale avec les composants lourds, les neutrons interagissent avec les protons présents au niveau des noyaux atomiques et sont donc sensibles aux isotopes des atomes. Les études de SANS ne nécessitent donc pas l'incorporation d'atomes lourds au sein des macromolécules. De plus, les neutrons étant 200 000 fois moins énergétiques que les rayons X, les dégâts engendrés sur les protéines lors de essais de diffusions sont considérablement limités [76]. La caractérisation SANS constitue donc une approche attrayante dans le cadre des études structurales d'échantillons biologiques sensibles.

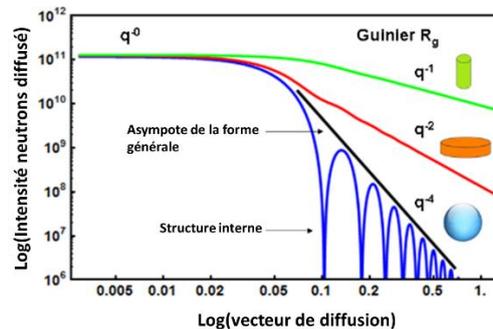


Fig.2.1.20 : Allures des courbes d'intensité de diffusion en fonction du vecteur de diffusion. Les courbes d'intensité de diffusion présentent des allures caractéristiques de la forme globale de la protéine : formes allongées (vert), aplaties (rouge) ou globulaires (bleu) [77]

Lors de la diffusion des neutrons par les protéines, l'intensité du faisceau réémis par les atomes de la protéine est enregistrée en fonction du vecteur de diffusion défini entre les rayons incidents et diffusés (Fig.2.1.19). L'allure de la courbe d'intensité fournit des informations initiales sur la forme globale de la protéine (Fig.2.1.20) [77].

L'analyse informatique des données de diffusion permet alors de produire un modèle *ab-initio* de la protéine correspondant à l'enveloppe globale de la macromolécule. La courbe d'intensité de diffusion théorique correspondant à ce modèle est ensuite calculée, permettant d'affiner ce dernier en faisant correspondre les données de simulation avec la courbe expérimentale. L'affinement se termine lorsque la courbe d'intensité diffusée issue du modèle se superpose à la courbe correspondant à la protéine en solution.

B. Matching point

Dans le cas des protéines membranaires, cette approche est significativement complexifiée par la présence, autour de la protéine d'une ceinture de détergent nécessaire à sa manipulation en solution.

En effet, lorsque ces échantillons sont exposés au faisceau de neutrons, les protéines ainsi que les détergents présentent un pouvoir de diffusion, représenté par les flèches oranges et rouges sur la figure de densité de longueur de diffusion (Fig.1.21.a), conduisant à un signal de diffusion incorporant les composantes respectivement issues des protéines et de leurs ceintures de détergents, conduisant ainsi à l'obtention d'un modèle plus large que la protéine seule, correspondant à la protéine associée aux micelles de détergents.

Cependant, il est possible, à travers des mesures d'intensité de diffusion obtenues sur les micelles de détergent seules (Fig.2.1.21.b) en faisant varier le pourcentage de deutération du solvant, de déterminer une condition, désignée par le terme « matching point », dans laquelle la contribution des micelles de détergent au signal de diffusion est confondue avec le solvant, et ainsi annulée.

Dans cette condition, représentée par le marqueur vert sur la figure des densités de longueurs de diffusion (Fig.2.1.21.a), bien que la contribution du détergent soit masquée, le contraste de la protéine est relativement faible par rapport au solvant. Il est alors nécessaire de procéder à la deutération de l'échantillon en exprimant la protéine dans un milieu minimum supplémenté en deutérium. L'incorporation de cet isotope, présentant un pouvoir de diffusion considérablement supérieur à celui de l'hydrogène permet d'augmenter le contraste de diffusion de la protéine par rapport au solvant comme indiqué sur la figure 2.1.21.b par la flèche bleue. Les différents contrastes du complexe protéine/détergents sont représentés dans la figure 2.20.

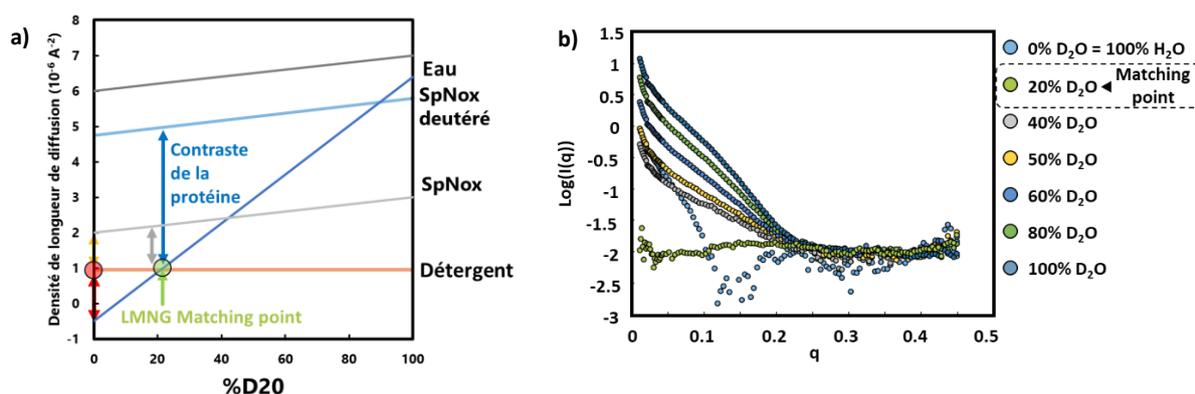


Fig.2.1.21 : Expérience de variation de contraste pour déterminer le matching point du détergent. (a) L'évolution de la densité de longueur de diffusion du solvant (bleu foncé), du détergent (orange), de la protéine native (gris clair) ainsi que de la protéine deutérée à 80% (bleu) ou 100% (gris foncé) est représentée en fonction du pourcentage de D_2O . Les flèches représentent les contrastes du détergent et des protéines natives ou deutérées par rapport au solvant. (b) Signal de diffusion des micelles de détergent en fonction de la deutération du milieu. Pour le détergent testé le matching point est atteint à pour 20% D_2O où le signal mesuré est plat en fonction du vecteur de diffusion q .

8. Caractérisations Biochimiques

A. Thermostabilité

La stabilité constitue un facteur essentiel pour la majorité des caractérisations impliquant des protéines *in vitro*. Les études structurales requièrent en particulier des échantillons généralement extrêmement stables et homogènes et il est donc important, à l'aide de l'évaluation de la thermostabilité, de s'assurer du maintien de la conformation native, ainsi que de la fonctionnalité de la protéine tout au long de l'expérience.

De plus, de nombreux facteurs ainsi que des variations soudaines des paramètres environnementaux peuvent influencer le repliement et les propriétés fonctionnelles des protéines. Un changement de pH, de concentration en sels, ou l'ajout de métaux lourds ou d'additifs peuvent affecter positivement ou négativement la stabilité de la protéine et altérer ses fonctions.

a. Les différentes techniques

Au cours des années, un nombre important de techniques expérimentales ont été développées pour évaluer et quantifier la structure et la stabilité des protéines, telles que la calorimétrie différentielle à balayage, le dichroïsme circulaire ou encore la spectroscopie de fluorescence différentielle, dont deux des méthodes utilisées au cours de ce travail de thèse (nanoDSF et ThermoFAD) sont directement issues, et leur description sera donc développée de manière plus approfondie.

Spectroscopie de fluorescence différentielle à balayage (DSF)

L'étude de la stabilité des échantillons biologiques peut être évaluée par des mesures de fluorescence émise par la protéine d'intérêt en cours de dénaturation. L'élévation progressive de la température entraîne la dénaturation de l'échantillon, s'accompagnant d'une variation rapide de la fluorescence et permet ainsi la caractérisation de la température de demi-dénaturation (T_m) de la protéine. L'utilisation de la spectrofluorimétrie, rapide et nécessitant peu d'échantillon est adaptée au criblage haut débit d'un grand nombre de conditions expérimentales afin d'optimiser la thermostabilité d'un échantillon. Différentes versions de cette technique ont été adaptées selon l'origine de la fluorescence mesurée qui peut être intrinsèque (nanoDSF), ou résulter d'une molécule initialement liée au sein de la protéine native, tel qu'un cofacteur (ThermoFAD) ou un chromophore hydrophobe (Thermofluore).

b. ThermoFAD

Le ThermoFAD (Thermofluor-adapted flavin ad hoc detection system) est une technique spécifique des flavoprotéines, dérivant de la méthode Thermofluore, au sein de laquelle un marqueur fluorescent, l'orange SYPRO, est lié de manière non spécifique aux surfaces hydrophobes. A l'état natif, les motifs hydrophobes des protéines, enfouis au cœur des macromolécules, sont inaccessibles au chromophore qui demeure en solution, et dont la fluorescence est éteinte par les molécules de solvant. Lorsque la température appliquée augmente, le dépliement de la protéine conduit à une exposition progressive des régions hydrophobes avec lesquelles peuvent interagir le fluorophore, aboutissant par exclusion des molécules d'eau, à une forte augmentation de la fluorescence émise à la longueur d'onde d'émission spécifique de l'orange SYPRO. Cependant, cette technique n'est pas adaptée à l'étude des protéines membranaires en raison de la nécessité d'ajout de colorants externes incompatibles avec la présence de micelles de détergents qui empêchent une détermination fiable du T_m .

Contrairement au Thermofluore, la technique du ThermoFAD, qui repose sur la fluorescence intrinsèque à 535nm du cofacteur FAD lié au sein des flavoprotéines constitue une méthode particulièrement adaptée pour la caractérisation des flavoprotéines membranaires telles que SpNox. La fluorescence à 535nm, spécifique du FAD, est directement modulée par l'environnement dans lequel il se trouve. Ainsi, lors de la dénaturation de l'échantillon induite par l'élévation de température, le cofacteur, initialement enfoui au sein de la protéine, est alors exposé au solvant, conduisant à une augmentation de la fluorescence émise à 535nm permettant de suivre l'état de repliement de la protéine, et ainsi la détermination du T_m dans une condition donnée (Fig.2.1.22). Cette technique nécessite l'utilisation d'un échantillon ne contenant pas de FAD exogènes dans le tampon initial.

La transition de fluorescence observée lors d'une expérience de ThermoFAD témoigne d'une dénaturation locale au niveau du site de liaison au cofacteur FAD de la protéine mais ne reflète pas nécessairement le T_m correspondant à l'ensemble de la protéine. En effet, dans une protéine composée de plusieurs domaines, le cofacteur peut se trouver lié exclusivement à l'un des domaines et le T_m mesuré par ThermoFAD, représentera la dénaturation spécifique de celui-ci. De plus, dans certains cas le FAD peut se décrocher de la protéine avant que celle-ci ne soit dénaturée, conduisant alors à une mesure de $T_{m\text{ThermoFAD}}$ non représentative de la dénaturation de la protéine entière.

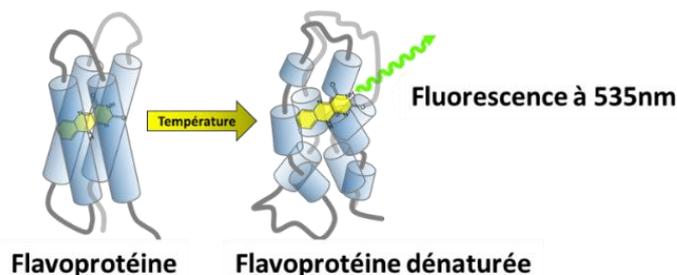


Fig.2.1.22 : Principe de spectroscopie de fluorescence par ThermoFAD. Le cofacteur FAD, dont la fluorescence à 535nm est sensible à l'environnement autour du cofacteur, est lié de manière covalente à la flavoprotéine. Lorsque la protéine est dans l'état natif, le ThermoFAD est enfoui au sein de la protéine. La dénaturation de la protéine conduit à l'exposition du FAD au solvant, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence à 535nm du cofacteur.

c. NanoDSF

La technique du nanoDSF (nano Differential Scanning Fluorimetry) permet l'évaluation de la thermostabilité des protéines en mesurant la fluorescence intrinsèque des résidus aromatiques (notamment tryptophanes) au sein de la protéine, traduisant dont l'état de repliement varie en cours de dénaturation. Sous l'effet de la dénaturation thermique, les résidus Tryptophanes, initialement enfouis au sein du cœur hydrophobe de la protéine à l'état natif ou masqués par les micelles de détergents (émission à 330nm) sont exposés au solvant, déplaçant alors le pic d'émission de fluorescence vers les longueurs d'ondes supérieures (émission à 350nm). Ainsi, la transition correspondant à la dénaturation de la protéine peut être obtenue en traçant le ratio des fluorescences à 350nm et à 330nm (F_{350}/F_{330}) en fonction de la température appliquée à l'échantillon, et l'extraction d'un T_m caractéristique de la protéine dans un environnement défini peut ainsi être obtenu sans ajout externe de colorant. De plus, la mesure étant réalisée au sein de capillaires, l'utilisation de cet équipement permet un criblage rapide de nombreuses conditions en parallèle et nécessite très peu d'échantillon.

Ainsi cette technique peut être utilisée pour cribler un grand nombre de paramètres pouvant affecter la stabilité de la protéine tels que la présence de ligands, d'inhibiteurs ou comparer différents variants d'une même protéine.

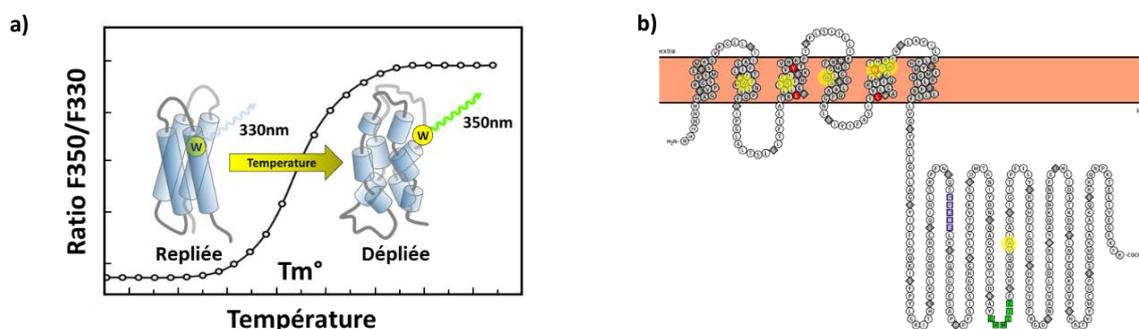


Fig.2.1.23 : Principe de spectroscopie de fluorescence par nanoDSF. (a) La mesure de thermostabilité par nanoDSF repose sur la fluorescence intrinsèque de la protéine due aux résidus aromatiques (en particulier tryptophanes) présents dans la séquence protéique. Lors de la dénaturation, les tryptophanes initialement enfouis dans le milieu hydrophobe au sein de la protéine se retrouvent exposés au solvant polaire, provoquant un décalage du pic d'émission de fluorescence de 330nm vers 350nm. Le ratio F_{350}/F_{330} tracé en fonction de la température permet de déterminer le T_m de la protéine. (b) Répartition des résidus Trp (O) dans la séquence de SpNox.

B. L'ultracentrifugation analytique (AUC)

L'ultracentrifugation des macromolécules conduit à la migration des protéines vers l'extérieur du tube et à la formation du culot. La lecture à intervalle de temps régulier de l'absorbance en fonction de la distance à l'axe de rotation permet d'obtenir la répartition des macromolécules dans la cellule de centrifugation et met en évidence la présence d'un front de migration se déplaçant vers le fond de la cellule au cours du temps. La position de ce front en fonction du temps permet de déterminer le

coefficient de sédimentation s caractéristique du poids moléculaire M de la macromolécule, de la différence de densité entre la macromolécule et le solvant, et du volume partiel spécifique de la macromolécule [78].

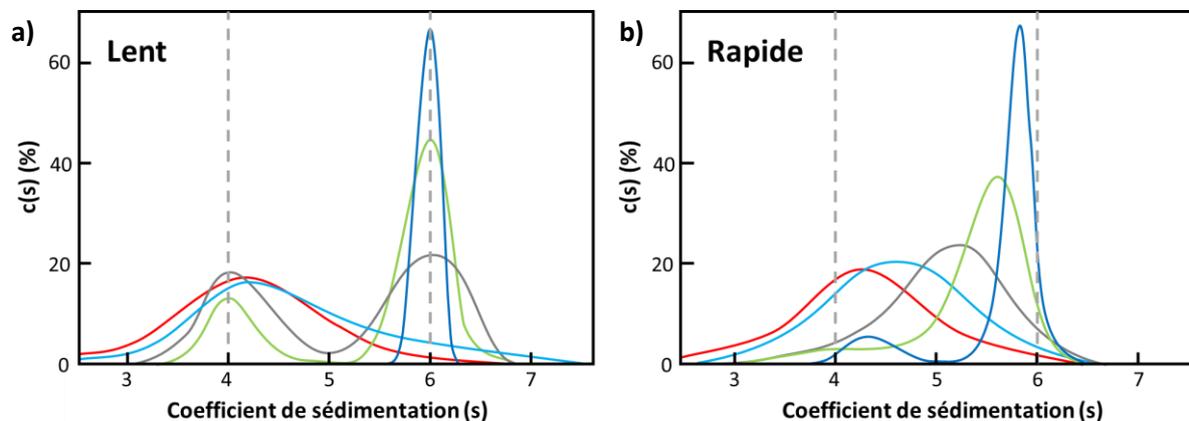


Fig.2.1.24 : Exemples de distributions $c(s)$ obtenues pour différentes concentrations de protéine dans le cas d'une protéine de 50kDa capable de former un dimère. La protéine à l'état monomérique et sous forme de dimère présente des coefficients de sédimentation de respectivement 4S et 6S. Dans le cas d'une association lente (a), les pics restent à la même position et seul le pourcentage de fraction monomérique et dimérique varie. Lorsque l'association de la protéine est rapide (b), un seul pic est observé et la valeur de s associé augmente avec la concentration en protéine [79].

L'une des applications les plus courantes de l'ultracentrifugation analytique est la détection et la caractérisation des interactions moléculaires. En effet, dans le cas d'un échantillon hétérogène, la lecture d'absorbance peut conduire à la présence de plusieurs fronts dont les coefficients de sédimentation sont associés aux différentes protéines en solution. Cependant, lorsqu'une interaction entre les macromolécules existe, la caractérisation du coefficient de sédimentation conduit à des résultats différents en fonction de la dynamique d'association/dissociation des protéines. Ainsi dans le cas d'une interaction lente entre deux protéines, les macromolécules isolées et complexées sédimentent selon des fronts distincts et la mesure aboutit à la détermination de plusieurs coefficients dont les valeurs ne changent pas en fonction de la concentration en protéine (Fig.2.1.24.a). A l'inverse, si la dynamique d'interaction est rapide, l'unique coefficient s correspond à la moyenne des coefficients de sédimentation des espèces individuelles (Fig.2.1.24.b) dont la valeur dépend des caractéristiques des espèces individuelles ainsi que de leur constante d'association relatives d'association et de séparation [79].

C. Activité enzymatique

a. Caractérisation de l'Activité cytochrome c réductase de SpNox

L'activité cytochrome c réductase correspond au transfert séquentiel d'électrons du substrat NADPH au cofacteur FAD puis à chacun des groupements hémiques et enfin à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire, pour produire l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (Fig.2.1.25.a). En présence d'anions superoxydes, le cytochrome c, utilisé en tant que molécule rapportrice, est réduit conduisant à une augmentation de son absorbance à 550nm. Le suivi de l'absorbance à 550nm en présence de SpNox, FAD, NADPH et du cytochrome c au cours du temps permet de déterminer la vitesse de réduction du cytochrome c, et ainsi le calcul de l'activité cytochrome c réductase (Fig.2.1.25.b).

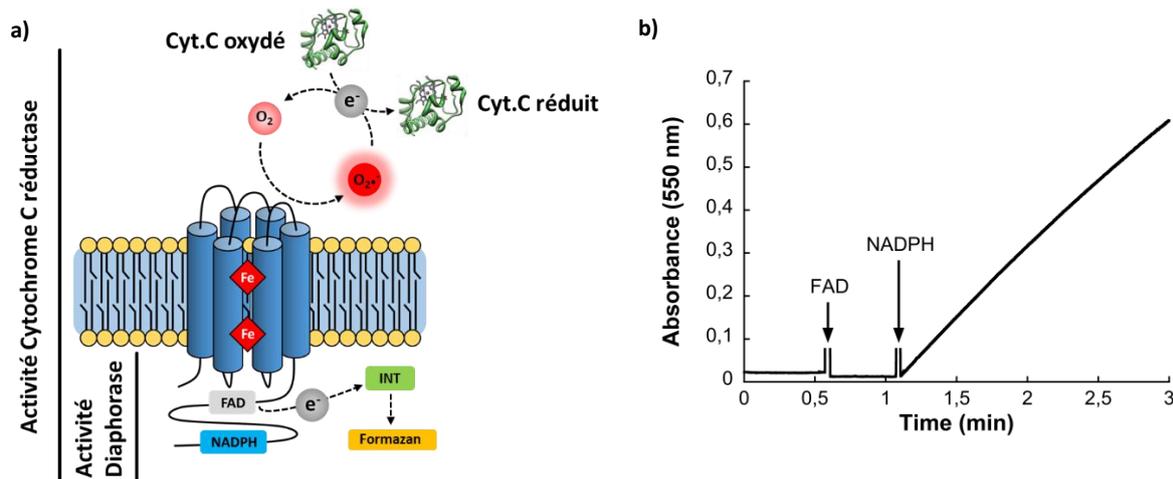


Fig.2.1.25 : Mesure de l'activité cytochrome c réductase de SpNox. (a) Principe de la mesure de l'activité cytochrome c réductase par suivi de la réduction du cytochrome c par l' $O_2^{\bullet-}$ produit par la Nox procaryote. (b) Suivi de la réduction du cytochrome c (Cyt. C) par mesure d'absorbance à 550nm en présence de SpNox, Cyt.C 100 μ M, FAD 10 μ M et NAD(P)H 200 μ M.

L'activité diaphorase, correspondant au transfert d'électrons du NADPH vers le FAD cytosolique peut également être caractérisée par réduction du cytochrome c issu du transfert d'électrons de NADPH au FAD, en absence de transfert d'électron du FAD vers les hèmes.

D. Analyse spectrale

a. Spectre différentiel

A l'état oxydé, les hèmes du cytochrome b_{558} présentent un pic d'absorbance proche de 410nm, correspondant à la bande de Soret, provenant d'une oscillation de dipôle électronique qui permet une transition $\pi-\pi^*$, commune chez les protéines hémiques. La réorganisation des orbitales électronique suite à la réduction du groupement hémique conduit au décalage du pic à 414nm vers les longueurs d'ondes plus élevées (426nm) ainsi que l'apparition de deux pics additionnels à 530nm et 558nm. Ainsi le spectre différentiel obtenu par soustraction du spectre d'absorption d'une protéine oxydée au spectre de la protéine réduite, permet de mettre en évidence deux pics principaux à 426nm et 530nm caractéristiques de la présence de groupements hémiques dans la macromolécule [1] (Fig.2.1.26). Celui-ci permet notamment de vérifier la présence de protéines contenant des hèmes au sein des membranes.

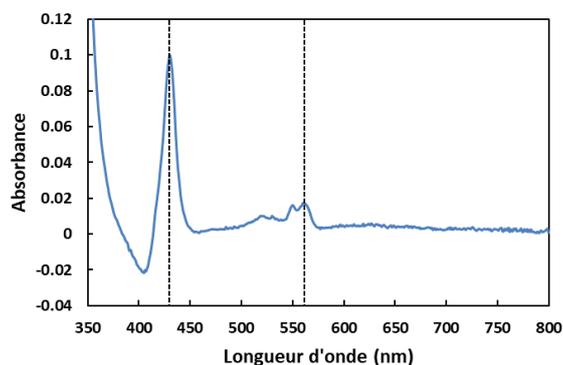


Fig.2.1.26 : Spectre différentiel des membranes exprimant SpNox. Le spectre différentiel est obtenu en soustrayant le spectre oxydé au spectre réduit des membranes avec SpNox.

b. Spectre de la protéine purifiée

Les protéines hémiques telles que SpNox présentent à l'état oxydé un pic d'absorbance caractéristique à 414nm, (Fig.2.1.27) tandis que les protéines, présentent un pic à 280nm. La pureté de l'échantillon ainsi que le nombre d'hèmes dans la protéine peuvent ainsi être déterminés par calcul

du ratio d'absorbance A_{414nm}/A_{280nm} . Les coefficients d'extinction molaire de SpNox à 280nm et 414nm étant relativement proche (respectivement $98881M^{-1}.cm^{-1}$ et $127893M^{-1}.cm^{-1}$) le rapport des concentrations en protéines purifiées contenant des hèmes (A_{414nm}) et de concentrations en protéines totales (A_{280nm}), est approximativement égal au ratio absorbances A_{414nm}/A_{280nm} . Ainsi, si SpNox lie deux hèmes, le ratio A_{414nm}/A_{280nm} théorique présenté devrait être proche de 2.

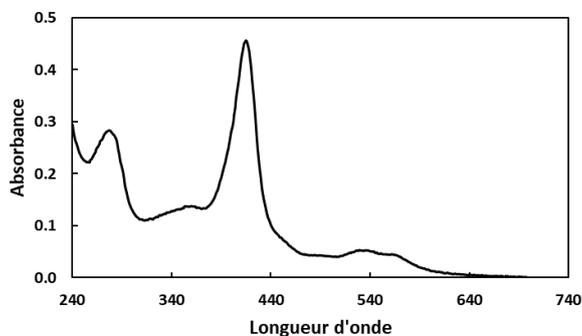


Fig.2.1.27 : Spectre d'absorbance entre 240 et 800nm de la protéine purifiée SpNox. La présence d'hèmes se caractérise par la présence d'un pic à 414nm au sein de la bande de Soret permettant d'évaluer le nombre d'hèmes à l'aide du ratio A_{414nm}/A_{280nm} .

La concentration ainsi que la qualité des fractions de purification sont évaluées par spectrométrie entre 240 et 800nm. La lecture d'absorbance à 414nm est spécifique des centres héminiques présents dans SpNox et permet d'évaluer la concentration en SpNox à partir de la masse molaire de la protéine et de son coefficient d'absorption molaire préalablement déterminé.

$$C_{SpNox}(mg/ml) = \frac{A_{414nm} * MM(g.mol^{-1})}{\epsilon_{SpNox}(M^{-1}.cm^{-1})}$$

De plus, comme la mesure d'absorbance à 280nm est proportionnelle à la quantité de protéines totales en solution, la pureté de l'échantillon peut être évaluée à l'aide du ratio A_{414nm}/A_{280nm} .

E. SEC-MALS

La technique de chromatographie d'exclusion de taille (SEC) couplée à la diffusion de lumière multi-angles (MALS) et à la réfractométrie (RI) fournit une mesure absolue de la masse molaire des particules en solution et renseigne sur les états d'oligomérisation de celles-ci. Lors de la chromatographie d'exclusion de taille, réalisée sur une colonne (Superdex S200 Increase (GE Healthcare) équilibrée dans le tampon de gel filtration et calibrée à l'aide de quatre protéines de rayon de Stokes connus, les particules sont éluées en fonction de leur taille sous la forme de pics d'éluion (Fig.2.1.28).

En sortie de colonne, la mesure de diffusion de lumière sur 18 angles (détecteur DAWN-EOS (Wyatt)) fournit des intensités proportionnelles au produit de la concentration et de la masse moléculaire des particules éluées, tandis que la réfractométrie (détecteur rEX) permet de déterminer la concentration. Ainsi, pour chaque point du chromatogramme le SEC-MALS donne une moyenne de la masse moléculaire permettant de déterminer la masse molaire des différentes espèces résolues par la colonne. En reportant sur le profil d'éluion la masse molaire en fonction du volume, l'homogénéité d'une espèce moléculaire éluée dans un pic chromatographique peut être estimée. Lorsque la masse moléculaire est constante sur l'ensemble du pic, la particule est éluée de manière monodisperse. En revanche, un pic d'éluion contenant différentes espèces ne pouvant être résolues par SEC montre une variation de la masse molaire au sein du pic.

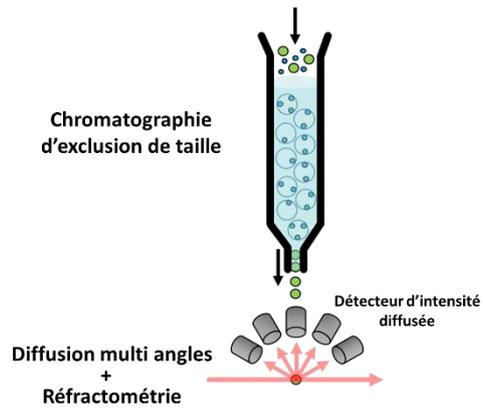


Fig.2.1.28 : Principe du SEC-MALS. Lors d'une mesure SEC-MALS, une chromatographie d'exclusion de taille est réalisée et les protéines éluées de la colonne en fonction de leur taille sont exposées à un faisceau de lumière. L'intensité diffusée par les protéines est collectée par 18 détecteurs répartis sur 360° autour de la protéine afin de fournir des informations sur la concentration et la masse moléculaire des particules éluées.

1. Biologie moléculaire

A. Nomenclature associée aux différentes constructions

Dans la suite du manuscrit, les différentes constructions de la protéine sont regroupées sous le terme générique SpNox. La construction de la protéine entière sauvage est désignée par SpNox ou SpNox_{FL}. La construction du domaine transmembranaire de SpNox (pET30b-His-SpNox_{TM}) correspondant aux résidus N-terminaux M1-Q180 de SpNox est désignée par SpNox_{TM}. La construction du domaine déshydrogénase de SpNox (pET30b-His-K181) correspondant aux résidus C-terminaux K181-K400 de SpNox est indifféremment désignée par SpNox_{DH}. La position des résidus mutés au sein des variants de SpNox_{DH} est donnée par rapport à la SpNox_{FL} pour éviter une confusion entre des noms de mutations dont la position est différente alors qu'il s'agit du même acide aminé au sein de la protéine entière ou d'un sous domaine. Lorsqu'il est nécessaire de le préciser WT suit le nom de la protéine pour indiquer qu'il s'agit de la version sauvage, ou respectivement F397W, F397S, F399W, F399S, W289F, Y122A, W125A, R126 pour désigner l'un des variant de SpNox_{FL} ou SpNox_{DH}.

L'ensemble des caractéristiques relatives aux constructions, aux protéines résultantes ainsi que les coefficients d'extinctions molaires associés sont présentés dans les fiches plasmides en annexes

B. Clonage du gène de SpNox dans le plasmide d'expression

Le gène codant pour SpNox, optimisé pour l'expression dans E. coli (Genscript) est amplifié par PCR et sous cloné dans le plasmide pET-30b (Novagen) entre les sites NdeI et BamHI permettant l'ajout N-ter d'une étiquette polyhistidine (7 His) ainsi qu'un site de clivage à la thrombine, sous le contrôle d'un promoteur T7 inductible à l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) et portant une résistance à la kanamycine.

C. Création des vecteurs des variants de SpNox

Les constructions sont réalisées par mutagenèse dirigée (QuikChange[®] Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent) selon le protocole décrit dans le manuel du fournisseur à partir des amorces et plasmides indiqués (Tab.2.2.1) en substituant lors de l'étape de transformation le milieu NZY+ préconisé par du milieu SOC. L'ADN d'un clone isolé est amplifié (E.Z.N.A.[®] Plasmid DNA Mini Kit I - Spin Protocol, Omega Bio-tek) selon les instructions fournies puis la construction est vérifiée par séquençage. L'ensemble des séquences correspondantes aux différentes constructions et mutants sont présentées en annexes.

Mutation Name	Primer name	Sequence	Template	T _m (°C)
W289F	ForSpNoxW289F	GGTCGCGAAAACCAAGTTtttATTGCAGGCGGTATTGGC	pET30b-His-SpNox	68
	RevSpNoxW289F	GCCAATACCGCCTGCAAT _{aaa} AAGTTTTCGCGACC	pET30b-His-SpNox	
TM	ForSpNox _{TM}	CATCATCTTCTGTACCAGtgaAAAATTAGCTTCCGTATCTG	pET30b-His-SpNox	65
	RevSpNox _{TM}	CAGATACGGAAGCTAATTTTccaCTGGTACAGGAAGATGATG	pET30b-His-SpNox	
F399W	ForSpNoxF399W	GATCTACGAAGGCTTCAAAtggAAATGAGAATTCGAGCTCCG	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	67
	RevSpNoxF399W	CGGAGCTCGAATTCTCATTccaTTTGAAGCCTTCGTAGATC	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	
F399S	ForSpNoxF399S	GATCTACGAAGGCTTCAAAtctAAATGAGAATTCGAGCTCCG	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	66
	RevSpNoxF399S	CGGAGCTCGAATTCTCATTtagaTTTGAAGCCTTCGTAGATC	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	
F397W	ForSpNoxF397W	CGGAACTGATCTACGAAGGctggAAATCAAATGAGAATTCGAG	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	67
	RevSpNoxF397W	CTCGAATTCTCATTGAATTTccaGCCTTCGTAGATCAGTTCCG	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	
F397S	ForSpNoxF397S	ACGGAAGTCTACGAAGGctctAAATCAAATGAGAATTCGAGC	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	67
	RevSpNoxF397S	GCTCGAATTCTCATTGAATTTagaGCCTTCGTAGATCAGTTCCGT	pET30b-His-SpNox, pET30b-His-K181	

Tab.2.2.1 : Amorces utilisées pour réaliser les différentes constructions de SpNox

2. Biochimie

A. Production des protéines recombinantes

Une souche de bactéries E. coli C41-DE3, optimisée pour l'expression des protéines membranaires, est transformée par choc thermique, avec le plasmide pET30b-His, portant une résistance à la kanamycine, ainsi que le gène de la construction adéquat de SpNox en aval d'une étiquette poly-histidines (7His) et d'un site de clivage à la thrombine (LVPR|GS). Une pré-culture est réalisée dans du milieu LB contenant de la kanamycine (50mg/L) inoculé à partir d'une colonie isolée et cultivés 16h à 37°C sous agitation à 180rpm puis la culture estensemencée en milieu LB ou TB supplémenté en kanamycine (50mg/L) par dilution ($F_D=1/40$) de la pré-culture et incubé à 37°C sous agitation orbitale à 180rpm. Lorsque $DO_{600nm}=1.2$, l'induction de l'expression de SpNox est initiée par ajout d'IPTG (0.2mM) puis les bactéries sont cultivées 3,5h à 37°C sous agitation orbitale à 210rpm. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation (5000rpm, 20mn, 4°C, rotor JLA8.1000) et les culots bactériens sont congelés à l'azote liquide et conservés à -20°C.

B. Lyse cellulaire

Les cellules bactériennes resuspendues à l'aide dans un tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH7, 250mM NaCl, 10% glycérol) supplémenté d'anti-protéases (cOmplete™ EDTA-free) et de DNase (10µg/ml) sont lysées mécaniquement (microfluidizer Microfluidics M-110P, 14000psi, 4 passages) puis les cellules non brisées, les corps d'inclusion, et les débris contenus dans le culot sont éliminés par deux centrifugations basse vitesse successives (20mn, 8000g, 4°C, rotor Beckman 850) du lysat cellulaire. Le surnageant contenant les membranes est ensuite ultracentrifugé (36800rpm, 45mn, 4°C, Beckman Optima LE-80K, rotor BeckmanTi-45). Le culot contenant les vésicules membranaires avec SpNox est resuspendu (50mM Tris-HCl pH7) et les protéines membranaires totales sont quantifiées par dosage à l'acide bicinchoninique (BCA) et la concentration est ajustée à 20mg/ml. La présence de SpNox au sein des membranes est vérifiée par caractérisation spectrale du contenu héminique et de l'activité cytochrome c réductase de SpNox par spectrophotométrie avant congélation à l'azote liquide et conservation à -80°C.

C. Solubilisation des membranes

Les membranes contenant 240mg de protéines membranaires totales sont ensuite solubilisées à 0.6mg/ml dans un tampon de solubilisation (50mM Tris-HCl pH7, 300mM NaCl, 5mM LMNG (0.5%), selon les expériences ce tampon est additionné ou non de 10 µM FAD (excepté pour les échantillons dont les étapes ultérieures sont réalisées en absence de FAD) et incubées 16h à 4°C sous agitation rotative (15rpm).

D. Purification

a. Constructions issues de SpNox entière (SpNox_{FL}) ou du domaine TM (SpNox_{TM})

1. Purification de référence en LMNG

La purification est réalisée (en deux étapes) sur la plateforme de purification multi-étapes automatisée des protéines (MP3) (Akta Xpress, GE Healthcare) à l'aide d'une chromatographie d'affinité au nickel (NiNTA) suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille (avec un débit de 1ml/min). Les membranes solubilisées sont ultracentrifugées (36800rpm, 45mn, 4°C, Beckman Optima LE-80K, rotor Beckman Ti-70) pour éliminer les particules insolubles, puis le surnageant de solubilisation est chargé sur une colonne préconditionnée HisTrap HP (1ml, GE Healthcare) équilibrée dans un tampon d'équilibration (50mM Tris-HCl pH 7, 300mM NaCl, 5mM (0.5%, 50CMC) LMNG, FAD 10µM), puis deux lavages successifs sont réalisés respectivement avec le tampon d'équilibration puis un tampon de lavage (50mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 0.1 mM LMNG (0.01%, 10 CMC), 10 µM FAD, 90 mM imidazole). La protéine est éluée avec un tampon d'éluion (50 mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 0.025 mM LMNG ((0.0025%, 2.5 CMC), 10 µM FAD, 300 mM imidazole).

CMC _{LMNG} (H2O) =0.01mM (0.001%)	Tampons de purification en LMNG				
	Tris-HCl pH7	NaCl	LMNG	FAD	Imidazole
Tampon d'équilibration NiNTA	50mM	300mM	5mM (0.5%)	10µM	0M
Tampon de lavage NiNTA	50mM	300mM	0.1mM (0.01%)	10µM	90mM
Tampon d'éluion NiNTA	50mM	300mM	0.025mM (0.0025%)	10µM	300mM
Tampon de filtration sur gel	50mM	300mM	0.025mM (0.0025%)	10µM	0M

Tab.2.2.2 : Tampons de purification en LMNG

Grâce à la détection automatique du pic d'éluion (A_{280nm}) du chromatogramme, l'échantillon est collecté puis automatiquement chargé (4ml) sur chromatographie d'exclusion de taille (HiLoad 16/600 Superdex S200, GE Healthcare) pré-équilibrée avec du tampon de filtration sur gel (50 mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 0.025 mM LMNG ((0.0025%, 2.5 CMC), 10 µM FAD). Le profil de la chromatographie d'exclusion de taille présente un pic principal correspondant à une forme monomérique de SpNox,

ainsi qu'un épaulement correspondant potentiellement à un état dimérique. Après déconvolution du chromatogramme, les fractions correspondantes contenant la protéine d'intérêt sont sélectionnées et regroupées et concentrées par ultrafiltration (Amicon® Ultra-4 50K) puis conservées à 4°C. La concentration de SpNox_{FL} est déterminée par spectrophotométrie avec un coefficient d'extinction molaire ϵ_{414nm} de 220842 M⁻¹cm⁻¹. La concentration de SpNox_{TM} est déterminée par spectrophotométrie avec un coefficient d'extinction molaire ϵ_{280nm} de 43890 M⁻¹cm⁻¹.

2. Purification en HEPES

Pour les conditions expérimentales nécessitant l'utilisation de tampon HEPES, les protocoles de la solubilisation de référence et de la purification sont adaptés en substituant le Tris-HCl pH7 par de l'HEPES pH 8 dans tous les tampons.

3. Purification en DDM

Les protocoles de solubilisation des membranes et purification de référence sont adaptés en substituant le détergent dans les tampons par du DDM.

CMC _{DDM} (H2O) =0.17mM (0.0087%)	Tampons de purification en DDM				
	Tris-HCl pH7	NaCl	DDM	FAD	Imidazole
Tampon de solubilisation	50mM	300 mM	5mM (0.26%)	10µM	0M
Tampon d'équilibration NiNTA	50mM	300mM	5mM (0.26%)	10µM	0M
Tampon de lavage NiNTA	50mM	300mM	2mM (0.1%)	10µM	90M
Tampon d'éluion NiNTA	50mM	300mM	0.3mM (0.015%)	10µM	300mM
Tampon de filtration sur gel	50mM	300mM	0.3mM (0.015%)	10µM	0M

Tab.2.2.3 : Tampons de purification en DDM

4. Purification en DMNG

Les protocoles de solubilisation des membranes et purification de référence sont adaptés en substituant le détergent dans les tampons par du DMNG.

CMC _{DMNG} (H2O) =0.036mM (0.0034%)	Tampons de purification en DMNG				
	Tris-HCl pH7	NaCl	DMNG	FAD	Imidazole
Tampon de solubilisation	50mM	300 mM	5.3mM (0.5%,)	10µM	0M
Tampon d'équilibration NiNTA	50mM	300 mM	5.3mM (0.5%)	10µM	0M
Tampon de lavage NiNTA	50 mM	300 mM	0.1mM (0.01%)	10µM	0M
Tampon d'éluion NiNTA	50 mM	300 mM	0.1mM (0.01%)	10µM	300mM
Tampon de filtration sur gel	50 mM	300 mM	0.1mM (0.01%)	10µM	0M

Tab.2.2.4 : Tampons de purification en DMNG

b. Constructions issues du domaine DH de SpNox (SpNox_{DH})

1. Production

La production des constructions du domaine DH de SpNox (SpNox_{DH}) est réalisée de manière similaire à la procédure décrite pour la protéine entière (SpNox_{FL}), en milieu TB. L'expression de SpNox_{DH} est induite par ajout d'IPTG (1mM), puis les bactéries sont cultivées 16h à 18°C sous agitation à 180rpm.

2. Purification

Les cellules bactériennes resuspendues à l'aide dans un tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH7, 1M NaCl, 5% glycérol, 10mM imidazole) supplémenté d'anti-protéases (Complete™ EDTA-free) et de DNase (10µg/ml) sont lysées par sonication (1min, Pulse 0.25, Puissance 100%) puis les cellules non brisées, les corps d'inclusion, et les débris contenus dans le culot sont éliminés par centrifugation (20mn, 18500rpm, 4°C, rotor Beckman JA20) du lysat cellulaire. Le surnageant contenant les protéines solubles totales avec SpNox_{DH} est chargé sur une résine NiNTA équilibrée avec le tampon de lyse, puis lavée

abondamment avec un tampon de lavage (50mM Tris-HCl pH7, 1M NaCl, 5% glycérol, 20mM imidazole) et éluée avec un tampon d'éluion (50mM Tris-HCl pH7, 1M NaCl, 5% glycérol, 300mM imidazole). Le tampon des fractions sélectionnées est ensuite échangé (PD-10 desalting column, GE Healthcare) selon le protocole du fournisseur pour un tampon (50mM BTP pH 6.5, 300mM NaCl, 5% glycérol) permettant une stabilité optimale de SpNox_{DH}. Après concentration (Amicon® Ultra-4 50K), l'échantillon est injecté sur chromatographie d'exclusion de taille (0.8ml/min, HiLoad 16/600 Superdex S75 pg, GE Healthcare) puis les fractions contenant SpNox_{DH} sont aliquotées et congelées à l'azote liquide et conservées à -80°C.

Tampons de purification du domaine DH de SpNox					
	BTP pH 6,5	Tris-HCl pH7	NaCl	Glycérol	Imidazole
Tampon de lyse et d'équilibration NiNTA	0M	50mM	1M	5%	10mM
Tampon de lavage NiNTA	0M	50mM	1M	5%	20mM
Tampon d'éluion NiNTA	0M	50mM	1M	5%	300mM
Tampon de filtration sur gel	50mM	0M	300mM	5%	0M

Tab.2.2.5 : Tampons de purification du domaine DH de SpNox (SpNox_{DH})

A. Caractérisation biochimique

a. Spectre différentiel des membranes SpNox

Les membranes sont diluées à 0.1mg/ml dans du tampon Tris 50mM pH7. Les spectres des membranes oxydées ou réduites avec du dithionite de sodium sont enregistrés au spectrophotomètre (Cary 50 Bio) entre 240nm et 800nm dans une cuve en quartz de 200µl et de 1cm de trajet optique. La signature spectrale présente deux pics à 426 et 562nm caractéristiques de la présence d'hèmes fonctionnels au sein de la protéine.

b. Electrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE)

1. Préparation des échantillons pour SDS-PAGE

L'expression des protéines est contrôlée par prélèvement de 5ml de culture avant et après induction, respectivement avant supplémentation en IPTG ou en fin de culture. Les cellules sont collectées par centrifugation puis resuspendues dans 500µl de bleu de charge dénaturant puis lysées par sonication (1min, Pulse 0.5, Puissance 80%) puis $\frac{12.5}{D_{0600nm}}$ µl d'extraits bruts sont déposés sur gel d'acrylamide 12% (construction de SpNox_{FL}) ou 15% (constructions tronquées de SpNox).

Les échantillons prélevés au cours de la purification sont dilués dans du tampon Laemmli (J61337, Thermo Fisher Scientific). La caractérisation des différentes étapes de solubilisation et purifications est généralement réalisée sur 10µl d'échantillon dans le tampon Laemmli.

2. Migration

La migration (200V, 45min, Mini-Protean Tetra Cell Bio-Rad) est ensuite suivie à l'aide du marqueur de poids moléculaire des protéines précoloré (26616, Thermo Fisher Scientific).

3. Révélation

Coloration au bleu de Coomassie

Un gel d'acrylamide est coloré (Quick Coomassie Stain, Generon) afin de révéler les protéines séparées par électrophorèse.

Coloration au nitrate d'argent. Un gel d'acrylamide est incubé 1h dans une solution de fixation (30% éthanol, 10% acide acétique) puis lavé 3 fois 15min dans de l'éthanol 25% et rincé 2 fois 10min dans l'eau. Après incubation 2min dans du Thiosulfate de Sodium (2,5mM), le gel est rincé deux fois 5min dans l'eau, incubé 30min à l'obscurité dans 100ml de bain d'argent (1,18mM Nitrate d'argent, 29,6% Formaldéhyde) et enfin rincé deux fois 1min dans l'eau avant révélation dans 100ml de solution (28,3mM Na₂CO₃ anhydre, 18,5% Formaldéhyde, 20mM Thiosulfate de Sodium). Le développement de la coloration est fixé par ajout de 10ml d'acide acétique glacial.

c. Western Blot

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide sont transférées (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Biorad), selon l'application envisagée, sur membrane de nitrocellulose (révélation) ou PVDF (séquençage N-ter) selon les instructions du fournisseur. Les sites d'interactions non-spécifiques sont saturés pendant 1h à l'aide d'un tampon (PBS-Tween20, 5% lait) puis la membrane est incubée en présence d'anticorps primaires de souris anti-polyhistidine couplés à la peroxydase de radis noir (A7058-1VL, Sigma). Après trois lavages successifs (5min, PBS-Tween20), les protéines d'intérêt sont détectées indirectement par révélation de l'étiquette polyhistidine (Sigmafast 3,3'-Diaminobenzidine, D4168, Sigma) selon la procédure indiquée par le fournisseur.

d. Chromatographie sur couche mince

10µl d'échantillon sont déposés sur une plaque de silice puis la migration est réalisée dans une cuve de migration avec un solvant Chloroforme/Méthanol/H₂O (65/35/5) pendant 20min. La révélation est ensuite réalisée par vaporisation d'un mélange 50% acide sulfurique/20% éthanol sur la plaque de silice, ensuite chauffée à 200°C.

e. Activité enzymatique cytochrome c réductase

L'activité enzymatique de la protéine (0.25µg) ou des protéines membranaires totales (10µg) est évaluée à 25°C par suivi spectrophotométrique de réduction du cytochrome c (A_{550nm}) par l'anion superoxyde produit par SpNox [1]. Le test est initié par ajout successif des réactifs NADH (200mM) et FAD (10µM) à 0.25µg de protéine en présence de cytochrome c (100mM) dans le tampon de filtration sur gel déplété en FAD. La vitesse initiale est ensuite calculée par régression linéaire de la courbe aux temps initiaux de la réaction (30s) afin de déterminer l'activité spécifique ($mol_{Cyt c \text{ réduit}}/s/mol_{Spnox}$)

f. Détermination des paramètres catalytiques

L'affinité des protéines pour le substrat NAD(P)H est évaluée à partir de tests d'activité réalisés en triplicat sur une gamme de concentration en NAD(P)H en présence de 10µM FAD. La détermination approximative du $K_{mNAD(P)H}$ est obtenue à l'aide d'une gamme préliminaire dont les différents points sont réalisés par dilution en cascade ($F_D = 1.6$) à partir d'une concentration maximale connue comme saturante de NAD(P)H.

Puis ces résultats sont utilisés pour l'ajustement de la concentration maximale de NAD(P)H permettant la réalisation d'une seconde gamme de résolution supérieure dans la zone d'intérêt de la courbe donnant accès à une détermination du K_m plus précise. La courbe de Michaelis et Menten obtenue en traçant la moyenne des triplicats des vitesses initiales ($\mu M \cdot s^{-1}$) en fonction de la concentration de substrat est analysée à l'aide du logiciel Prism® afin d'extraire les valeurs de $K_{mNAD(P)H}$ et de V_m .

Une procédure similaire est appliquée pour déterminer les paramètres enzymatiques de SpNox pour le cofacteur flavine en présence de 200 µM de NADPH. Afin de pouvoir comparer les affinités pour le substrat et le cofacteur des constructions entière ou tronquée, l'ensemble des caractérisations cinétiques ont été réalisées dans le tampon de filtration sur gel de du domaine DH de SpNox (SpNox_{DH}).

g. Evaluation de la thermostabilité par nanoDSF

La protéine est concentrée (3800rcf, 8mn, 4°C) par ultrafiltration sur membrane (Amicon Ultra-4, 50kDa) équilibrée avec du tampon de filtration sur gel (50 mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 0.025 mM LMNG ((0.0025%, 2.5 CMC), 10 μ M FAD). La concentration protéique dans les conditions expérimentales testées est fixée à 1mg/mL final de SpNox, après dilution du stock de protéine (5mg/mL) dans du tampon de filtration sur gel, respectivement de SpNox_{FL} ou SpNox_{DH}, avec ou sans FAD selon les conditions testées et les échantillons. Les mélanges sont ensuite dégazés (14000rpm, 4mn, 4°C, rotor FA-45-18-11, 5418 R Eppendorf) puis précautionneusement homogénéisés à la pipette avant chargement des capillaires (10 μ l). Les expériences de dénaturation thermale sont réalisées par des mesures de spectroscopie de fluorescence différentielle couplée à la diffusion de lumière (Prometheus NT.48, Nanotemper Technologies) et les paramètres d'excitation (généralement fixés à 70%) sont adaptés à l'aide d'un melting scan préalable au suivi de la dénaturation (F350/F330) entre 15 et 95°C (1°C/min). La reproductibilité des mesures est évaluée (PR.thermocontrol) par la reproduction indépendante de chacune des conditions expérimentales en triplicat. 10 μ l d'échantillon sont introduits dans des capillaires standards qui sont ensuite chargés sur le porte-échantillon permettant un criblage de 48 conditions en parallèle. L'excitation à 280nm est préalablement optimisée afin de mesurer des intensités de fluorescence émises à 330 et 350nm entre 5000 et 16 000u.a à la température initiale du test. La température de fusion a été mesurée en suivant la variation du ratio des fluorescence émises à 330nm et 350nm selon un gradient de température croissant de 15° à 95°C appliqué par palier de 1°C/min à l'échantillon. Le signal obtenu est ajusté à l'aide d'une loi polynomiale d'ordre 8 à partir de laquelle est calculée la première dérivée. La température de fusion est déterminée aux températures pour laquelle la première dérivée du ratio de fluorescence (F350/F330) est maximale. L'intensité de la lumière diffusée, mesurée en parallèle de dénaturation, permet d'extraire la température d'agrégation (T_{agg}) de la protéine. En absence d'agrégats dans l'échantillon, la lumière incidente peut-être absorbée par l'échantillon ou réfléchi. L'agrégation sous l'effet de la dénaturation de l'échantillon induite par l'augmentation de température entraîne la diffusion de la lumière incidente dans toutes les directions de l'espace. Le T_{agg} est défini comme la température pour laquelle le niveau de lumière diffusée présente une augmentation supérieure à 10% de la valeur initiale.

Les températures caractéristiques de fusion (T_m) et d'agrégation (T_{agg}) ont été extraites avec le logiciel PR.ThemControl.

Les résultats des expériences de nanoDSF et d'activité ont été analysés simultanément en utilisant le logiciel de statistique JMP® pour réaliser le diagramme 2D en fonction du pH et des concentrations en sel. La médiane de triplicats a été utilisée pour établir le graphique et une interpolation linéaire a été réalisée pour prédire la fiabilité ou l'activité sur l'ensemble des conditions représentées. Une interpolation linéaire à 2 dimensions a été réalisée sous Python® à partir des données de thermostabilité et d'activité pour produire un graphique en 3 dimensions.

3. Bioinformatique

A. Alignements de séquences

Un large ensemble de 549 séquences homologues de NOX comportant approximativement un nombre équivalent de séquences procaryotes et eucaryotes a été aligné à l'aide de MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) [80]. Les séquences ont été scindées en domaines transmembranaire (TM) et déshydrogénase (DH) respectivement identifiés par homologie, puis réalignés séparément avec PROMALS3D [81]. L'alignement du TM a été contraint à la structure cristallographique du domaine transmembranaire de CsNox (500T), tandis que l'alignement du DH a été contraint à la

structure cristalline du domaine déshydrogénase de CsNox (5O0X) ainsi que des homologues du domaine DH (1GJR, 1FNB, 1GVH, 2EIX, 3A1F), avec tous les paramètres fixés selon les valeurs par défaut. Les alignements multiples résultants ont été analysés avec Jalview [82] puis les éléments de structures secondaires comportant des insertions inhabituellement grandes ont été retirés. Les séquences résultantes ont ensuite été filtrées selon une identité de 91% (domaine TM) ou de 95% (domaine DH) puis l'ensemble de séquences obtenu (domaine TM : 172 séquences et domaine DH : 207 séquences) a finalement été réaligné dans PROMALS3D avec les paramètres par défaut et les mêmes contraintes structurales que celles préalablement spécifiées.

B. Génération du modèle d'homologie

La construction respective des modèles structuraux des domaines TM et DH a été initiée en soumettant indépendamment les séquences correspondant à chacun des domaines au serveur I-TASSER [83]. I-TASSER a identifié 4EH1 comme l'homologue le plus proche du domaine DH de SpNox (SpNox_{DH}). Le domaine TM de SpNox (SpNox_{TM}) a été modélisé avec comme modèle homologue le domaine TM de CsNox (5O0X). Les modèles résultants ont été visualisés et structurellement superposés avec les structures cristallographiques de CsNox correspondantes à l'aide de Chimera [84]. La boucle D du modèle SpNox_{TM} a été reconstruite à l'aide de SuperLooper [85] avec A110 et W121 définis comme ancrures membranaires, respectivement N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter). La boucle présentant une orientation similaire à celle de CsNox ainsi que le score le plus élevée a été acceptée. Le modèle d'homologie incluant la boucle en D remodelisée a été comparée à la structure du domaine TM de CsNox dans Chimera à l'aide de l'outil Matchmaker selon les valeurs par défaut. Pour la construction du modèle structural de la protéine entière, les modèles d'homologie des domaines TM et DH de SpNox ont été dockés ensemble à l'aide de la fonction Chimera Matchmaker par alignement structural de chaque domaine sur la structure arrimée des domaines TM et DH de CsNox [86] fournie par le Dr. Magnani.

4. Cristallographie aux rayons X

A. Cristallogenèse screen automatique au robot :

Les échantillons protéiques sont dégazés (14000rpm, 4mn, 4°C, rotor FA-45-18-11, 5418 R Eppendorf) et les agrégats protéiques éliminés par filtration (Ultrafree[®]-MC 0.1µm 0.5ml, Merck Millipore) avant cristallogenèse. L'identification des conditions de cristallisation a préalablement été réalisée à l'aide d'un criblage de matrices de solutions commerciales en plaque 96 puits à l'aide du robot de la plateforme de cristallisation haut débit du HTX Lab de l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) selon les instructions fournies [87]. L'évaluation des gouttes est réalisée en ligne puis les données sont mise en forme (Excel[®]) et analysée avec le logiciel de statistique JMP[®].

B. Cristallogenèse manuelle

Les conditions de cristallisation de SpNox ont été testées par diffusion en phase vapeur par la technique de la goutte suspendue. 1000µl de solution de précipitant sont introduits dans le réservoir d'une microplaque 24 puits pré-siliconée. 1µl de protéine purifiée et concentrée ([SpNox]_{LMNG}~7.5mg/ml) additionnée ou non, selon les conditions expérimentales, de 0.2µl d'additif (HR2-428, Hampton Research) ou de 0.5µl seeds (HR4-782, Hampton Research) d'après les procédures associées aux kits respectifs, est mélangée sur une lamelle de verre à 1µl de solution du réservoir puis la lamelle est retournée au-dessus de celui-ci et la graisse aplatie afin de le sceller. La plaque est ensuite conservée à 20°C.

C. Traitement des données

Les jeux de données de diffraction sont obtenus en illuminant, par rayons X, un cristal de protéine dont l'orientation est modifiée suivant des pas de 0.5° ou 1° afin de rapidement mettre en condition de diffraction une grande partie des réflexions de l'espace réciproque. Les intensités diffractées sont enregistrées pour chacun des angles d'incidences sur des détecteurs bidimensionnels. Le temps d'exposition de l'échantillon est ajusté en fonction de l'intensité du faisceau incident et du pouvoir de diffraction du cristal. Pour ce projet de thèse, les données ont été collectées sur les lignes BM30a et ID30a-1 de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble offrant une gamme d'énergie comprise entre 10 et 120keV (0.01nm à 10nm).

h. La ligne de lumière FIP – BM30a

La ligne FIP-BM30a est une ligne automatisée (montage de l'échantillon, ajustement d'intensité, centrage du cristal et choix de longueur d'onde pour le SAD) permettant d'atteindre des longueurs d'onde comprises entre 0,7 et 1,8Å avec un faisceau de $300\mu\text{m}$ par $300\mu\text{m}$ peut être utilisée pour des expériences de diffraction classiques ou pour des expériences multi-longueurs d'onde exploitant la dispersion anormale (expériences SAD, MAD). Les échantillons sont placés sur une tête goniométrique (G-ROB) à 4 cercles et les données sont enregistrées par un détecteur (MARCCD (Charged Couple Device)). Un criblage rapide peut être réalisé afin de déterminer la nature et la qualité du cristal (protéine, sel...) et enregistrer quelques images pour obtenir les paramètres de maille ou un jeu complet de données sur l'ensemble des angles du cristal. Pendant toute la collecte, les cristaux sont maintenus à une température de 100K, grâce au système cryogénique (Oxford cryostream). Une analyse initiale des données est réalisée en cours d'acquisition permettant notamment d'extraire le groupe d'espace et les paramètres de maille du cristal.

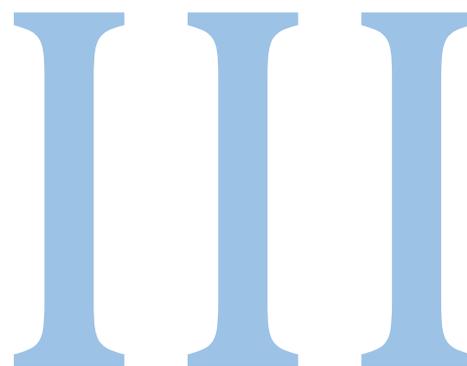
i. Les lignes de lumière ID30a-1/MASSIF-1

La ligne de lumière MASSIF-1 permet la collecte à haut débit de données de cristaux macromoléculaires et leur caractérisation de manière entièrement automatique facilitant le criblage des cristaux et collecte d'ensembles de données de routine. MASSIF-1 est un système intelligent autonome capable de sélectionner la stratégie optimale au cours du processus de caractérisation pour obtenir les meilleures données possibles à partir d'échantillons.

La ligne est pourvue d'un faisceau monochromatique dont la longueur d'onde est fixée à environ 0.97Å. Le diamètre du faisceau est compris entre 100 et $100\mu\text{m}$. La température du cristal est maintenue à 100K par un système cryogénique. La résolution maximale qu'il est possible d'atteindre est de 0.9Å

RESULTATS

Caractérisation structurale de
SpNox Entière



1

Optimisation de la thermostabilité et activité de SpNox pour les études structurales

1. Caractérisation de la qualité de l'échantillon de SpNox

En amont du projet de thèse, l'identification d'un homologue procaryote de NOX2 issu de *Streptococcus pneumoniae*, SpNox, permettant l'expression et la production recombinante de protéine en quantité suffisante pour la cristallogénèse a constitué une approche prometteuse vers la caractérisation structurale des NOX.

Cependant, bien que les criblages initiaux aient conduit à l'obtention de cristaux, leur caractérisation, conduisant à une résolution maximale limitée à 40Å, s'est révélée insuffisante pour accéder à des informations structurales aussi élémentaires que les paramètres de maille, et la résolution de la structure de SpNox est ainsi demeurée infructueuse.

Dans ces conditions, la recherche de nouveaux paramètres expérimentaux, permettant l'obtention de cristaux dont la diffraction des rayons X serait supérieure, a ainsi été indispensable. Celle-ci a été initiée grâce à une stratégie impliquant l'optimisation de la qualité de l'échantillon protéique, qui exerce généralement un impact direct sur la qualité des cristaux, en adaptant les paramètres intrinsèques à la purification selon des critères de thermostabilité et d'activité afin de préserver l'intégrité protéique dans les conditions de pureté et d'homogénéité optimales.

A. Caractérisation de la pureté et de l'homogénéité de SpNox à l'issue de la purification

Afin de favoriser la réussite de la cristallogénèse, notamment conditionnée par la pureté ainsi que l'homogénéité de l'échantillon initial, l'optimisation des conditions de purification suivie d'une étape systématique d'évaluation de la qualité de l'échantillon apparaît essentielle.

Ainsi, après une étape de solubilisation des membranes, l'échantillon au sein de micelles de détergent a été purifié par chromatographie d'affinité au nickel suivie d'une étape de filtration sur gel. Le chromatogramme obtenu par lecture d'absorbance à 280nm (Fig.3.1.1.a) révèle une première augmentation de l'absorbance étalée sur les faibles volumes d'élution (50ml) correspondant à l'agrégation de la protéine, significativement plus faible (10%_{A280nm}) que le pic principal (90%_{A280nm}) de la protéine purifiée, indiquant ainsi un faible taux d'agrégation de SpNox au cours de la purification. Le pic principal d'élution de SpNox (V~75ml) présente un épaulement (V~70ml), dont l'origine pourrait être attribuée à une protéine contaminante, ou témoigner de l'existence d'une forme moins compacte de la protéine pouvant correspondre à une espèce oligomérique de poids moléculaire supérieur, distinguable des agrégats présents en début d'élution. La migration sur gel d'acrylamide réalisée afin d'évaluer la présence et la pureté de la protéine au cours des différentes étapes de purification de SpNox, montre que le flow through (FT) permet l'élimination des protéines non retenues par la résine d'affinité au nickel. Bien que l'étape de lavage, réalisée en présence d'une concentration intermédiaire d'imidazole (90mM), permette une élimination efficace des contaminants, une quantité non négligeable de SpNox est également décrochée. La protéine monomérique pure peut être observée dans les fractions sélectionnées et regroupées (pool SN), dont la migration à ~37kDa ne correspond pas à la taille attendue (48kDa), probablement en raison du détergent lié à la protéine [1]. En prenant en compte le facteur de correction introduit pour les protéines membranaires, le poids moléculaire corrigé de la protéine serait de 42kDa, proche de celui de 48kDa attendu. Malgré l'écart de taille mis

en évidence, le western blot atteste que la protéine purifiée correspond à SpNox et indique que l'espèce présente au sein de l'épaulement correspond également SpNox, probablement sous forme oligomérique ou dans une conformation moins compacte. Cependant, la migration étant réalisée en conditions dénaturantes, la vérification de l'hypothèse de l'existence d'un état d'oligomérisation supérieur nécessitera des caractérisations biophysiques supplémentaires. La purification, évaluée avec un rendement de 35% (8mg extraits du pic principal, 4mg extraits de l'épaulement) à partir des fractions du pic principal sélectionnées et un degré de pureté supérieur en moyenne à 95%, s'avère efficace comme le révèle, au sein du pool SN, l'absence de contaminants initialement présents dans l'échantillon des membranes solubilisées. (Fig.3.1.1.b).

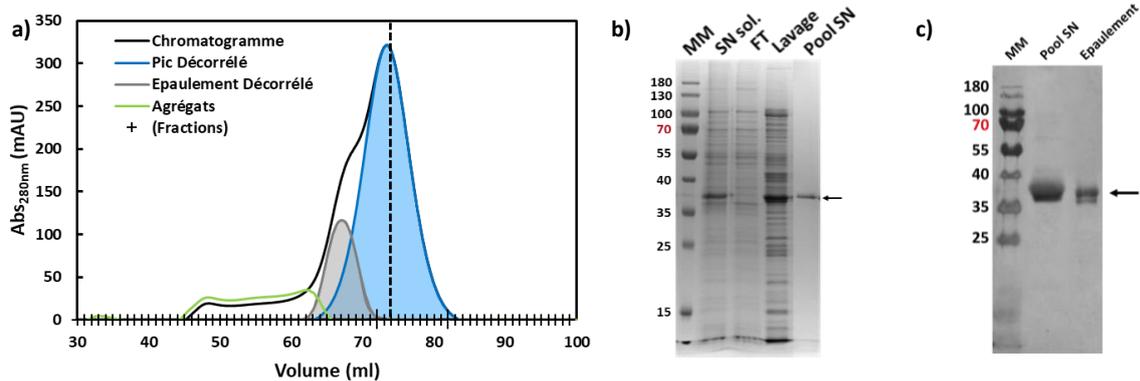


Fig.3.1.1 : Purification de SpNox en LMNG par chromatographie d'exclusion de taille. (a) Le chromatogramme est obtenu par mesure d'absorbance à 280nm en sortie de chromatographie d'exclusion de taille. L'épaulement (gris) est décorrélé du pic principal (bleu) afin de permettre la sélection et la caractérisation indépendantes des fractions issues de ces deux pics, en permettant d'identifier et d'exclure les fractions contenant un mélange d'espèces. Les pointillés verticaux délimitent les fractions du pic de monomère pur des fractions pouvant être contaminées par l'épaulement. (b) Différentes étapes de la purification, correspondant respectivement aux protéines membranaires solubilisées (SN sol.), au flow through (FT), au lavage contenant 90mM imidazole (Lavage) et au pool de monomère purifié (Pool SN) sont caractérisées par migration sur gel d'acrylamide 12%. Les pistes SNsol., FT et Lavage se réfèrent à différentes étapes de la chromatographie d'affinité au nickel (chromatogramme non montré) précédant l'étape de filtration sur gel, tandis que Pool SN correspond aux fractions issues du pic principal de la chromatographie d'exclusion de taille rassemblées de manière à obtenir un mélange homogène. MM désigne le marqueur de poids moléculaire. (c) Western Blot réalisé sur le pool SN. Les flèches indiquent la bande correspondant à SpNox.

Les fractions les plus pures et homogènes, correspondant au pic principal, ainsi que les fractions de l'épaulement, correspondant à un mélange d'espèces inhomogènes sont regroupées indépendamment pour les caractérisations biochimiques.

En effet, l'épaulement témoignant d'un mélange inhomogène de protéine lors de l'élution, dont la présence est potentiellement critique pour l'étape de cristallogénèse préalable à l'étude structurale de SpNox, il a été nécessaire d'exclure les fractions contaminées par l'épaulement et d'isoler les fractions constituant un échantillon homogène en décorrélant les différents pics du chromatogramme (Fig.3.1.1.b). Ainsi, la reconstitution de la forme putative du pic principal en absence d'épaulement est réalisée par duplication et symétrisation de la partie droite du pic (73-120ml), puis le pic correspondant à l'épaulement est reconstitué par soustraction de la modélisation du pic principal au chromatogramme expérimental permettant ainsi l'identification des limites séparant respectivement un mélange inhomogène d'espèces (épaulement + fractions initiales du pic principal) de la forme monomérique de SpNox (fractions tardives du pic principal) nécessaire aux études structurales et fonctionnelles (74-81ml).

La délimitation des agrégats est réalisée de la même manière en soustrayant le pic de l'épaulement symétrisé au chromatogramme principal afin de séparer le pic responsable de l'épaulement des espèces agrégées éluées en amont. Ainsi le chromatogramme final se compose de trois courbes, correspondant respectivement au pic principal de SpNox purifiée, au pic de l'épaulement et au profil du reste des espèces éluées (agrégats).

Des fractions de 1ml sont ensuite récupérées en sortie de la colonne d'exclusion de taille et la qualité et la pureté de ces fractions ont été analysées à l'aide d'un spectre d'absorbance entre 240 et 800nm. Le ratio d'absorbance A_{414nm}/A_{280nm} permet d'estimer le contenu en groupements héminiques (414nm) par rapport aux protéines totales purifiées (280nm), et constitue un moyen d'évaluer la pureté de l'échantillon ainsi que d'estimer l'intégrité de la protéine (Fig.3.1.2.a).

La superposition de l'évolution de la valeur du ratio A_{414nm}/A_{280nm} obtenu en fonction des fractions aux pics issus de la décorrélation du chromatogramme (Fig.3.1.2.b) montre que les fractions issues du pic principal présentent un ratio légèrement supérieur à 2, en accord avec la présence de deux hèmes au sein du domaine transmembranaire de SpNox. Malgré un ratio A_{414nm}/A_{280nm} de 1.8 légèrement inférieur, l'absorbance des fractions issues de l'épaulement semble également témoigner de la présence de deux hèmes au sein de la protéine. La présence d'agrégats protéiques dépourvus de groupements héminiques précédant directement l'élution de l'épaulement engendre, comme on peut l'observer grâce à la décorrélation chromatogramme, une contamination pouvant être à l'origine de la diminution du ratio d'absorbance correspondant à ces fractions. Afin de bénéficier d'échantillons les plus qualitatifs en termes d'homogénéité et de pureté pour les études structurales, seules les fractions présentant un ratio A_{414nm}/A_{280nm} supérieur à 1.8 sont prélevées.

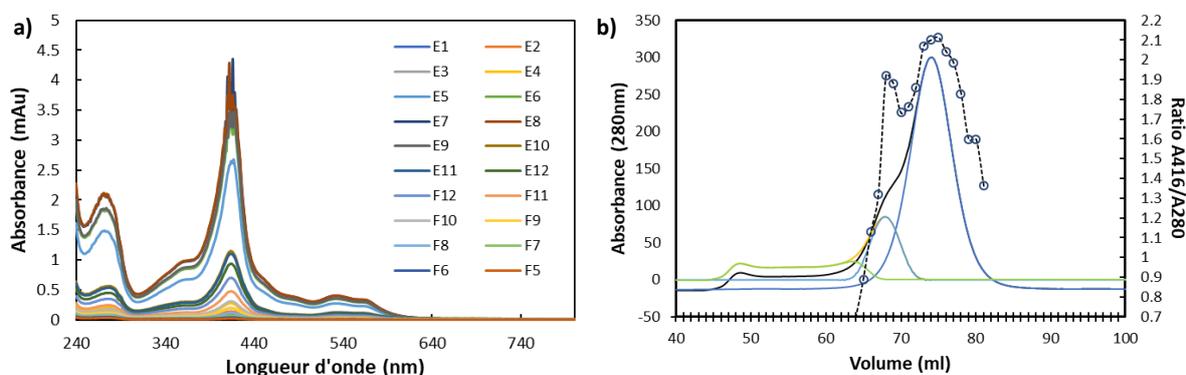


Fig.3.1.2 : Dosage spectrométrique des fractions de purification de SpNox. (a) Un spectre d'absorbance est réalisé entre 240 et 800nm afin d'évaluer le ratio A_{414nm}/A_{280nm} de chacune des fractions de purification de SpNox. (b) L'évolution des ratios en fonction des fractions est superposée aux pics d'élution du pic principal et épaulements obtenus par décorrélation du chromatogramme.

Les fractions correspondant au pic principal et à l'épaulement ont ensuite été regroupées indépendamment, puis respectivement soumises à une caractérisation biochimique extensive afin de confirmer la présence d'une forme alternative de SpNox au sein de l'épaulement.

B. Evaluation de l'état d'oligomérisation de SpNox

Afin d'évaluer la fonctionnalité des protéines issues de l'épaulement, des tests d'activité cytochrome c réductase ont été menés sur les deux pools issus de la purification de SpNox. La comparaison des tests d'activité témoigne d'activités spécifiques similaires entre la protéine issue du pic principal, supposée correspondre à SpNox sous forme monomérique et les fractions provenant de l'épaulement, respectivement égales à 2.95 ± 0.2 et 3.39 ± 0.33 mol_{Cytc réduit}/mol_{Spnox}/s en accord avec la présence de groupements héminiques au sein des deux formes, préalablement confirmée par la présence de maxima à 414nm sur les spectres d'absorbances (Fig.3.1.3). Ces résultats indiquent la fonctionnalité de ces deux formes de protéines.

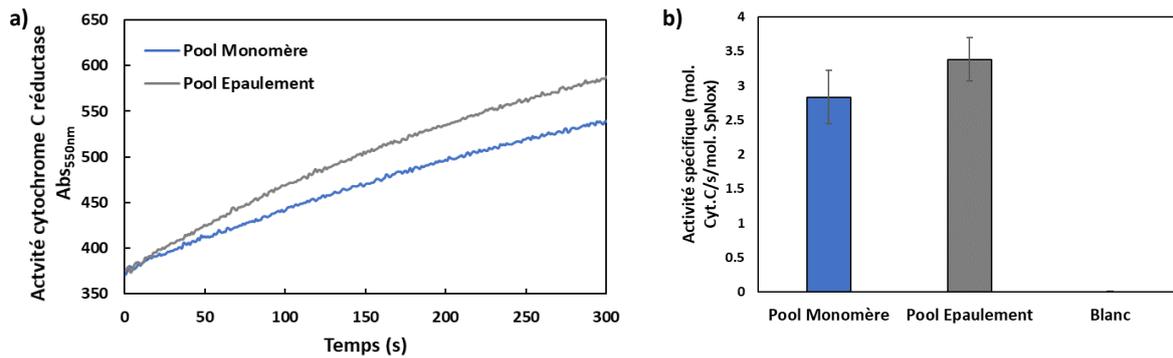


Fig.3.1.3 : Caractérisation de l'activité cytochrome c réductase des fractions purifiées issues respectivement du pic principal et de l'épaulement observés sur le profil d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille. (a) L'activité spécifique enzymatique est déterminée par suivi de la réduction du cytochrome c par mesure d'absorbance à 535nm après ajout des cofacteurs NADPH et FAD. (b) Activités spécifiques mesurées pour les fractions issues respectivement du pic principal et de l'épaulement et confrontées à un contrôle négatif réalisé avec le tampon réactionnel en absence de protéine.

L'homogénéité et l'état oligomérique des protéines provenant des deux pools ont ensuite été caractérisés par SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Laser Light Scattering). Les profils des trois fractions testées, supposées correspondre au monomère, présentent un pic principal de masse molaire de 49kDa confirmant l'état monomérique de SpNox liant 1.5mg de LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol). En revanche, le degré d'homogénéité apparaît variable en fonction de la fraction comme en témoigne la présence d'un épaulement dont l'amplitude décroît avec les fractions prélevées pour les plus grands volumes d'élution. L'analyse de cet épaulement révèle une masse molaire de 89kDa qui pourrait correspondre à SpNox sous forme dimérique liant 1.3mg de LMNG.

Concernant les fractions issues de l'épaulement de la chromatographie d'exclusion de taille, les trois profils présentent deux pics rapprochés qui témoignent de la présence de deux espèces en solution. L'analyse de ces pics révèle des masses molaires de 89kDa pouvant correspondre au dimère et de 123kDa qui pourrait correspondre à un trimère de SpNox. L'épaulement observé lors de l'élution en fin de purification peut ainsi être attribué à différents états d'oligomérisation de la protéine (Tab.3.1.1).

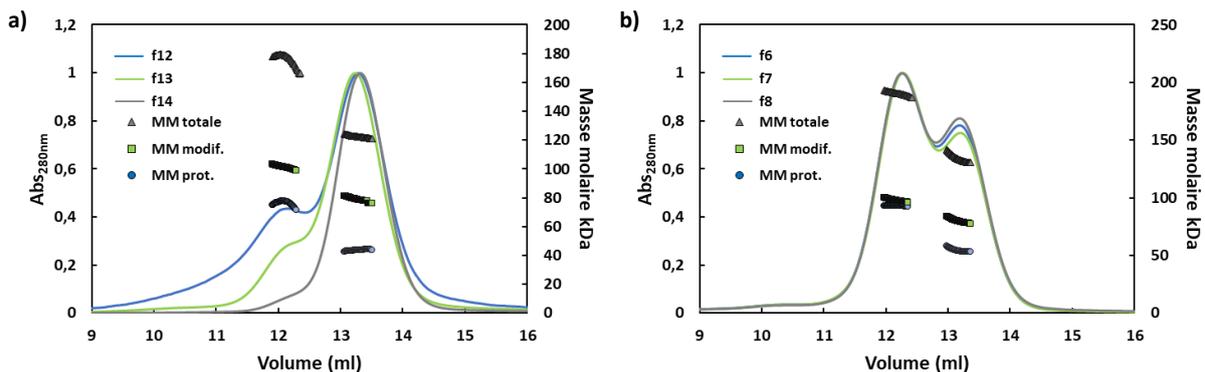


Fig.3.1.4 : Caractérisation de l'homogénéité et de l'état d'oligomérisation de SpNox par SEC-MALLS. (a) Les profils d'élution de trois fractions indépendantes issues du pic principal sont superposées pour montrer l'évolution de l'épaulement en fonction du volume d'élution de la fraction. (b) Les profils d'élution des trois fractions indépendantes issues de l'épaulement sont superposées, indiquant ainsi leur allure relativement similaire.

En revanche, la présence d'une faible proportion de dimère au sein des fractions monomériques peut s'expliquer par la contamination des fractions précoces du monomérique, la décorrélation montrant que les premières fractions peuvent être contaminées par le dimère ou pourraient provenir d'un échange dynamique entre les différents états d'oligomérisation de SpNox, au sein duquel la forme

dimérique pourrait être favorisée avec l'augmentation de la concentration en protéine. Le processus de cristallisation consistant en une précipitation ménagée par une augmentation de la concentration protéique, l'existence d'une forme dimérique de SpNox apparaissant au cours de la concentration pourrait impacter l'homogénéité de l'échantillon, constituant un paramètre essentiel à l'obtention de cristaux de qualité. Ainsi la caractérisation des éventuelles propriétés d'échange entre différents états oligomériques de la protéine apparaît primordiale, et a ainsi été évaluée à l'aide d'étapes successives de chromatographie d'exclusion de taille et d'ultracentrifugations analytiques (AUC).

	Fractions Monomère		Fractions Dimère	
MM protéine	49kDa	89kDa	89kDa	123kDa
MM détergent	1.5mg	1.3mg	1.3mg	1.3mg

Tab.3.1.1 : Masses molaires extraites de protéines et de détergents des fractions monomériques et dimériques déterminées par SEC-MALLS

Le LMNG forme des micelles dont la taille augmente avec la concentration expliquant ainsi que les micelles seules ne soient pas visualisables sur le profil de SEC-MALLS en raison de leur coélution avec le complexe protéine-détergent à la concentration en détergent expérimental.

C. Etude de la dynamique d'association/dissociation de SpNox

Les fractions correspondant à l'état monomérique de SpNox ont été regroupées et concentrées (Fig.3.1.5.a) avant de subir une nouvelle étape de chromatographie d'exclusion de taille. Le profil d'élution ne semble pas présenter d'épaule comparable à celui observé lors de l'étape précédente (Fig.3.1.5.b), suggérant l'absence d'un phénomène de dimérisation intervenant lors de la concentration de la forme monomérique ou l'existence d'un équilibre d'association lent. De même, les fractions provenant de l'épaule ont été réinjectées sur gel filtration (Fig.3.1.5.c). Cependant, en raison de la présence intrinsèque de la forme monomérique de SpNox au sein de cette fraction, le second chromatogramme correspond à la répartition des deux formes, respectivement au sein du pic principal attribué au monomère SpNox ainsi que dans l'épaule caractéristique du dimère dans des proportions ne permettant ni de confirmer ni d'exclure la création supplémentaire de forme dimérique. L'inhomogénéité initiale de cet échantillon ne permet donc pas de conclure sur la dynamique d'association/dissociation de SpNox, mais les informations apportées par le monomère semblent favoriser l'existence d'un équilibre lent.

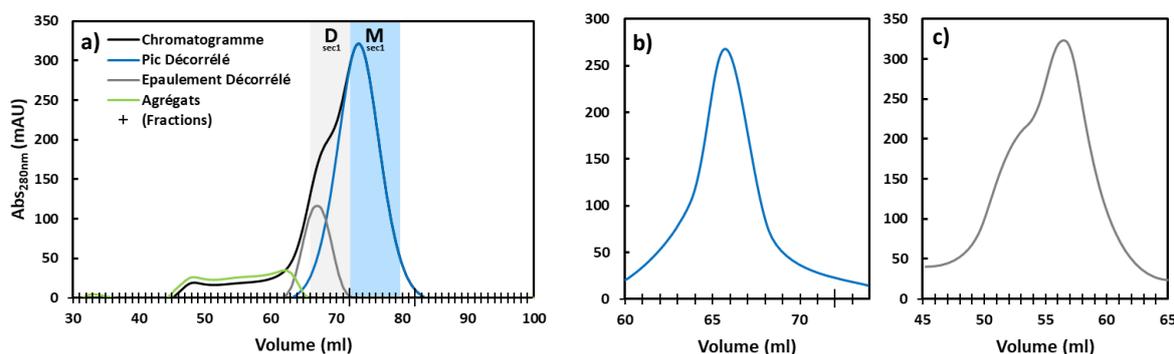


Fig.3.1.5 : Analyse de la dynamique d'association-dissociation de SpNox par chromatographies d'exclusion de taille successives. Les fractions Msec1 (b) et Dsec1 (c), respectivement attribuées à une forme monomérique ou dimérique de SpNox ont été réinjectées sur une seconde chromatographie d'exclusion de taille dont le profil d'élution est suivi par mesure d'absorbance à 280nm afin d'évaluer la redistribution des pics correspondants à chacun des états d'oligomérisation sur le profil d'élution.

Afin d'approfondir l'étude du mécanisme d'association de SpNox, des mesures de coefficient de sédimentation par ultracentrifugation analytique ont été réalisées sur les fractions issues du pic principal et de l'épaule du chromatogramme.

Les distributions de coefficients de sédimentation mesurées sur les fractions respectivement enrichies en monomères et dimères de SpNox révèlent dans les deux cas la présence de deux pics principaux (Fig.3.1.6) correspondant à des coefficients de sédimentation de 3.65S et 4.9S selon des proportions respectives de 77% et 20% attribuées au signal issu de l'échantillon monomérique ou 30% et 55% au sein de la fraction dimérique. L'analyse suggère que le pic à 3.65S pourrait correspondre à un monomère compact de SpNox liant 1.96g de LMNG ou à un dimère compact de 0.22g de LMNG (Tab.3.1.2). La masse de détergent prédite pour ce pic étant de 1.5 +/- 1g/g, de nouvelles estimations de la capacité ont été réalisées. Ainsi pour 1.5g/g de LMNG, le pic à 3.65S pourrait correspondre à un monomère globulaire compact ou un dimère allongé. Le pic à 4.9S pourrait être attribué à un dimère globulaire compact liant 1.2g/g de LMNG ou un trimère allongé de SpNox liant 1.2g/g de LMNG.

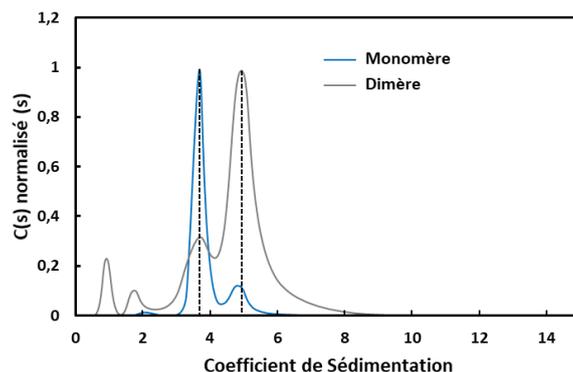


Fig.3.1.6 : Analyse des fractions monomériques et dimériques de SpNox par AUC. Les courbes de distribution de coefficients de sédimentation des fractions monomères (bleu) et dimériques (gris) ont été normalisées afin de permettre leur comparaison.

En supposant une quantité constante de détergent liée aux différents états d'oligomérisation (~1.5g/g) ainsi qu'une forme globulaire compacte de SpNox, les pics à 3.65 et 4.9S sont respectivement attribués à l'état monomérique et dimérique de SpNox.

	Pic à 3.75S		Pic à 4.9S
Monomère	Globulaire compact	Globulaire compact	x
LMNG lié au monomère	1.96g/g	1.5g/g	x
Dimère	Globulaire compact	Allongé	Globulaire compact
LMNG lié au dimère	0.2g/g	1.5g/g	1.2g/g
Trimère	x	x	Allongé
LMNG lié au trimère	x	x	1.2g/g

Tab.3.1.2 : Paramètres extraits des pics de distribution de c(s) lors des expériences d'AUC menées sur les fractions de monomères et de l'épaulement en supposant la présence de monomère, dimère ou trimère.

Contrairement aux caractérisations effectuées lors des chromatographies d'exclusion de taille successives, la réalisation d'ultracentrifugations analytiques fournissant une meilleure résolution des différents états oligomériques de SpNox, a permis de déterminer la présence de 20% de dimère au sein des fractions issues du pic principal, indiquant ainsi la possibilité d'une légère contamination des échantillons de monomère, ou l'existence d'une auto-association de monomères de SpNox au cours de la caractérisation. En revanche, l'identification de deux pics distincts semblerait indiquer que l'éventuelle dimérisation est réalisée selon un équilibre d'association relativement lent. Afin d'évaluer la dynamique d'association/dissociation de la protéine, des mesures AUC ont été réalisées sur les fractions dimériques de concentrations croissantes en protéines (Fig.3.1.7.a). L'analyse des distributions des coefficients de sédimentation en fonction de la concentration indique que les proportions de protéine à l'état monomérique et dimérique évoluent avec la concentration, confirmant ainsi l'existence d'un équilibre d'association/dissociation (Fig.3.1.7.b). De plus, la stabilité

des coefficients de sédimentation correspondants aux différents états oligomériques de SpNox coexistant démontre également que l'équilibre est lent.

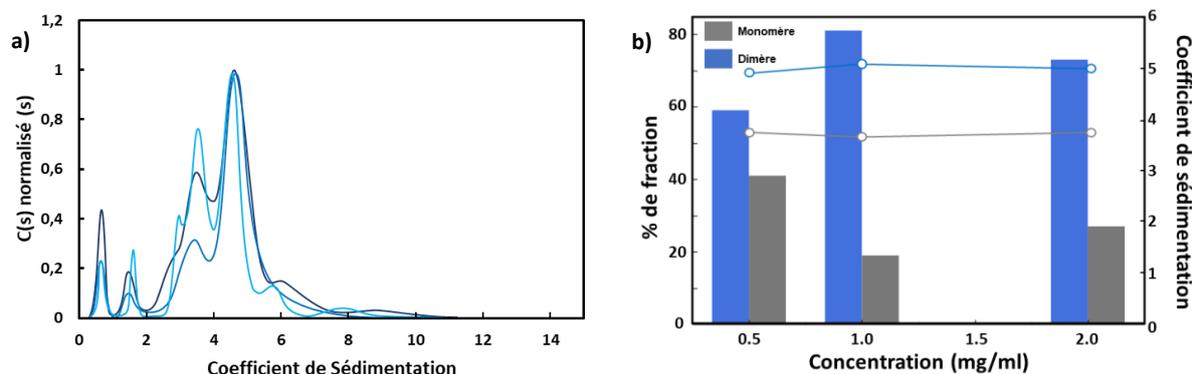


Fig.3.1.7 : Analyse de la dynamique d'association-dissociation de SpNox par AUC. (a) Les caractérisations AUC ont été réalisées sur les fractions dimériques à 0.5, 1 et 2mg/ml. (b) Coefficients de sédimentation (o) et pourcentages de fractions (histogramme) observés en fonction de la concentration de protéine pour chacun des pics respectivement attribués aux états monomériques et dimériques de SpNox.

En conclusion, la purification de SpNox conduit à l'élution de deux états d'oligomérisation de la protéine, monomérique et dimérique qu'il semble possible de séparer partiellement selon les indications apportées grâce à la reconstitution indépendante de l'allure de chacun des pics théoriques par décorrélation du pic principal et de l'épaule sur le profil d'élution. Les données suggérant une dynamique d'oligomérisation relativement lente, il semble ainsi adéquat de considérer les fractions correspondant à la forme monomérique de SpNox comme un échantillon pur et homogène compatible avec les études structurales. En revanche, la présence d'un mélange de différents états d'oligomérisation de la protéine au sein des fractions issues de l'épaule conduit à un manque d'homogénéité au sein de cet échantillon.

2. Optimisation de la thermostabilité de SpNox

Les études structurales envisagées nécessitent idéalement un échantillon initial pur, homogène et dont la stabilité est compatible avec la caractérisation d'une forme native de la protéine dont la structure serait la plus proche possible de l'état physiologique. La détermination de la composition du tampon, constituant l'environnement direct au sein duquel est la protéine est maintenue en solution doit ainsi être optimale, notamment pour divers paramètres physicochimiques essentiels tels que la force ionique, le pH, ou le détergent utilisé. De plus, il a également été montré que l'obtention de cristaux était corrélée à l'optimisation de la thermostabilité associée à une protéine [2]. Ainsi, afin d'améliorer la qualité des cristaux de SpNox, les conditions de stabilisation de la protéine (détergent, pH et concentration de sel) ont été déterminées à l'aide du nanoDSF, une technique développée récemment permettant la réalisation rapide d'un tel criblage pour l'identification des conditions optimales de conservation de la protéine préalablement aux études structurales.

A. Mesure de thermostabilité par nanoDSF

La technique du nanoDSF (nano Differential Scanning Fluorimetry) permet l'évaluation de la thermostabilité des protéines en mesurant la fluorescence intrinsèque des résidus aromatiques, notamment tryptophanes, au sein de la protéine, dont l'état de repliement varie en cours de dénaturation. Sous l'effet de la dénaturation thermique, les résidus Tryptophanes, initialement enfouis au sein du cœur hydrophobe de la protéine à l'état natif ou masqués par les micelles de détergents (émission à 330nm) sont exposés au solvant, déplaçant alors le pic d'émission de fluorescence vers les longueurs d'ondes supérieures (émission à 350nm). Ainsi, la transition correspondant à la dénaturation

de la protéine est suivie en traçant le ratio F350/F330 en fonction de la température appliquée à l'échantillon, et permet de déterminer la thermostabilité de l'échantillon dans une condition donnée.

En fonction du degré d'homogénéité de la répartition des résidus aromatiques dans la protéine, notamment au sein des protéines composées de plusieurs domaines, pour lesquelles le signal est équivalent à la résultante des dénaturations indépendantes de ceux-ci, les données mesurées en nanoDSF peuvent refléter la dénaturation d'une région spécifique de la protéine ou de la biomolécule entière. L'analyse de la séquence de SpNox révèle la présence de cinq résidus tryptophanes au sein du domaine transmembranaire et d'un dans le domaine déshydrogénase (Fig.3.1.8), indiquant que le Tm de SpNox extrait par nanoDSF résulte des événements de dénaturation simultanés ou non de chacun des deux domaines composant la protéine.

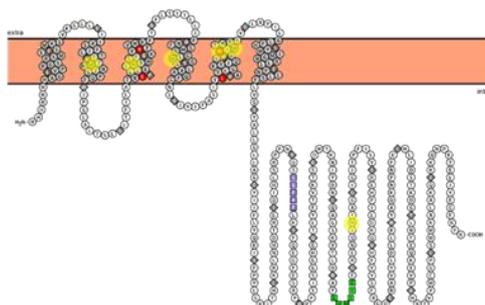


Fig.3.1.8 : Distribution des résidus tryptophanes au sein de la protéine de SpNox. Représentation Protter [3] de SpNox indiquant la présence au sein de la séquence protéique de 5 résidus tryptophanes (W) au sein du domaine TM et d'1 dans le domaine DH.

a. Optimisation des conditions de mesures

Afin de faciliter l'analyse des résultats à partir de l'extraction de paramètres de stabilité fiables et reproductibles, une expérience préliminaire définissant les conditions optimales de mesures au nanoDSF a été mise au point. Dans le but de déterminer la concentration en protéine optimale, une gamme de concentration a été testée pour des concentrations de SpNox comprises entre 0.8 et 8 mg/ml dans un tampon similaire à celui utilisé lors de l'étape de chromatographie d'exclusion de taille.

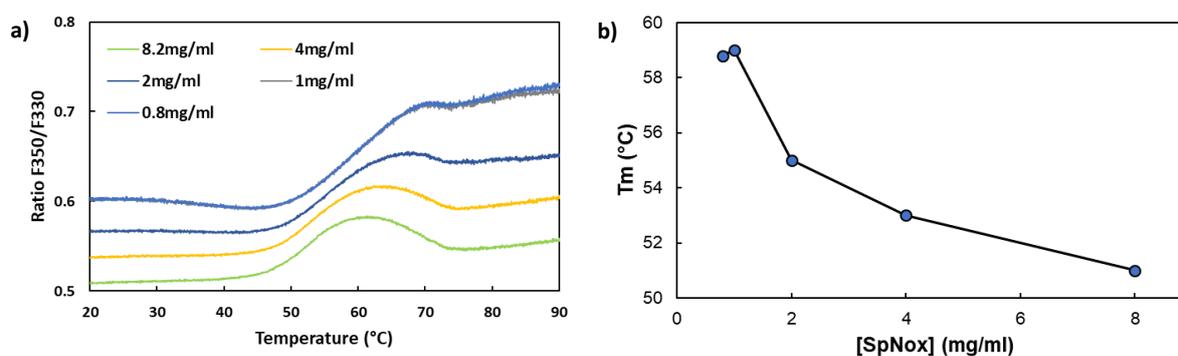


Fig.3.1.9 : Optimisation de la concentration de SpNox en LMNG pour les mesures de thermostabilité au nanoDSF. (a) Evolution des courbes de dénaturation F350/F330 en fonction de la concentration en protéine. (b) Evolution des valeurs de Tm extraites des courbes de dénaturation en fonction de la concentration de SpNox.

Des tests réalisés avec différentes concentrations en protéines ont démontré que l'allure du profil de dénaturation ainsi que le Tm extrait sont largement dépendants de la concentration en protéine. Pour des concentrations élevées, le ratio de fluorescence présente une courbe dont la forme en cloche est intensifiée avec l'augmentation de la concentration, avec une transition croissante entre 45 et 60°C, suivie d'une transition décroissante entre 60°C et 75°C pour 8mg/ml permettant l'extraction d'un Tm de 51°C (Fig.3.1.9.a). Cependant, en raison de la présence de la décroissance survenant à environ 60°C, ce profil présente une transition incomplète, conduisant à une détermination du Tm relativement imprécise. La diminution de la concentration en protéine conduit à une amélioration du profil, avec un

amortissement de la transition de dénaturation qui s'étend sur une gamme de températures entre 50°C et 70°C plus étendue, permettant ainsi une extraction du T_m plus précise. Le T_m ainsi extrait, correspondant à 59°C pour une concentration de SpNox de 1mg/ml, présente une augmentation de 17% par rapport à SpNox à 8mg/ml (Fig.3.1.9.b). Les données conduisant à une détermination systématique du T_m considérée exacte¹ sont obtenues pour une concentration de 1mg/ml et aucune amélioration supplémentaire ne peut être observée en réduisant encore la concentration en protéine.

Afin de comprendre l'influence de la concentration de SpNox sur l'allure de la courbe thermostabilité, l'analyse des courbes de diffusion, donnant accès à des informations sur l'agrégation de la protéine, a été réalisée en parallèle (Fig.3.1.10.a). Sous l'effet de la température, l'exposition des tryptophanes au solvant est responsable de la transition croissante observée pour des températures comprises entre 45°C et 60°C avec SpNox à 8mg/ml. Suite à l'exposition des régions hydrophobes, les protéines dénaturées s'agrègent, conduisant à nouveau au masquage des régions hydrophobes exposées, expliquant ainsi la perte de signal de fluorescence F350/F330 associée à la seconde transition décroissante.

Les courbes d'agrégation présentent, indépendamment de la concentration en protéines, une transition abrupte à une température comprise entre 65° et 70°, correspondant aux températures pour lesquelles le ratio F350/F330 diminue, semblant ainsi valider que l'apparition de la décroissance résulte du phénomène d'agrégation.

Le développement d'un modèle sigmoïdal permet la validation d'un tel comportement. Le modèle est construit en intégrant respectivement un T_m correspondant à la première transition, au cours de laquelle les résidus tryptophanes se retrouvent exposés au solvant suite à la dénaturation, ainsi qu'une température d'agrégation T_{ag} relative à la seconde transition décroissante au cours de laquelle les résidus aromatiques seraient à nouveau masqués, et à laquelle est associée un pourcentage d'agrégation inclus afin de moduler l'amplitude de la seconde transition :

$$\frac{F350}{F330}(T) = \alpha \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{T_m}{T}\right)^n} - \frac{\beta}{1 + \left(\frac{T_{ag}}{T}\right)^m} \right) + F_0 \quad \text{Eq.3.1.1}$$

Dans cette équation, α correspond à l'amplitude de la dénaturation en absence d'agrégation, β le pourcentage d'agrégation, et F_0 le ratio F350/F330 mesurés à la température initiale (20°C). Les facteurs n et m permettent d'ajuster la vitesse de dénaturation. Ainsi ce modèle permet de reproduire les profils décrits par les ratios mesurés grâce à l'utilisation des valeurs indiquées dans le tableau (Tab.3.1.3) en fixant notamment le T_{ag} à 70°C correspondant au T_{ag} expérimental, ainsi qu'un pourcentage de protéines agrégées (β) variant de 80% pour une concentration de 8mg/ml, à seulement 20% pour une concentration de 1mg/ml (Fig.3.1.10.b).

[SpNox]	α	T _m	n	β	T _{ag}	m	F ₀
1mg/ml	0.2	60	9	0.2	70	16	0.58
4mg/ml	0.2	60	9	0.7	70	16	0.53
8mg/ml	0.11	55	12	0.8	70	16	0.51

Tab.3.1.3 : Valeurs des paramètres utilisés pour l'ajustement des courbes de dénaturation en considérant le phénomène d'agrégation à l'aide de l'équation 3.1.1.

¹ La détermination systématique du T_m est considérée exacte lorsque le T_m extrait par le logiciel correspond effectivement au milieu de la pente de transition de dénaturation.

L'agrégation des protéines permet donc d'expliquer les profils mesurés lors de cette expérience. Les valeurs de T_m utilisées pour les ajustements montrent qu'à faible concentration de protéine, la valeur de thermostabilité extraite par cette méthode (60°C) est similaire à celle donnée par le nanoDSF (59°C). En revanche pour les concentrations plus élevées (4mg/ml), le T_m extrait en tenant compte de la dénaturation reste égal à 60° contrairement à la valeur mesurée par l'appareil de seulement 53°C , confirmant ainsi que si l'agrégation des protéines n'est pas prise en compte, les concentrations élevées de SpNox conduisent à des valeurs erronées de thermostabilité.

Cette optimisation permet ainsi de définir une concentration optimale de 1mg/ml , présentant le T_m le plus élevé et le plus faible pourcentage de protéines agrégées, qui sera ainsi utilisée pour les expériences ultérieures.

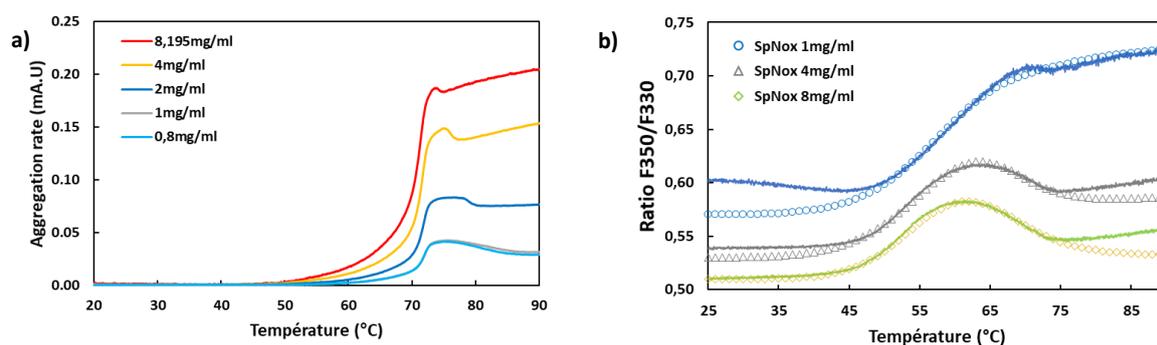


Fig.3.1.10 : Impact de l'agrégation des protéines de SpNox sur les courbes de thermostabilité. (a) Evolution des courbes de diffusion permettant de détecter l'agrégation de la protéine en fonction de la concentration en protéines. (b) Ajustement des courbes de dénaturation mesurées à 1,4 et 8mg/ml à l'aide du modèle décrit par Eq.3.1.1 et des paramètres de Tab.3.1.3

Afin de déterminer à partir de quelle variation de température deux valeurs de T_m pouvait être considérées comme significativement différentes, une analyse de répétabilité a été réalisée grâce à la détermination du T_m de SpNox issus de quatre purifications indépendantes réalisées dans les conditions identifiées comme optimales pour les études structurales (Fig.3.1.11). Cette étude met en évidence une variabilité de thermostabilité entre les différentes purifications de SpNox de $\pm 1,5^\circ\text{C}$. Cette valeur est sensiblement plus importante que la reproductibilité associée à des mesures réalisées sur plusieurs échantillon issus d'une même purification de la protéine et évaluée à $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Ainsi, il sera donc important de considérer cette variabilité lors de la recherche de conditions stabilisantes, en prenant invariablement comme référence une protéine issue de la même purification que les échantillons à tester, et en s'assurant que les variations de T_m observées lors du criblage sont significatives par rapport à la reproductibilité de mesure.

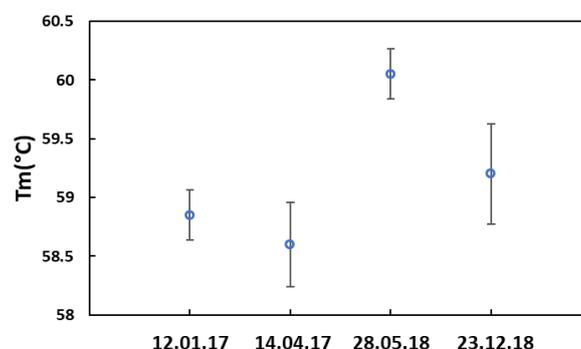


Fig.3.1.11 : Reproductibilité et répétabilité de la mesure de thermostabilité de SpNox issue de différentes purifications.

b. Thermostabilité des fractions monomère et dimère de SpNox

La réalisation d'une gamme de concentration sur SpNox a permis la détermination de la concentration optimale en protéine afin d'obtenir un profil de thermostabilité permettant une interprétation et l'extraction du Tm de manière fiable. Cette étude préalable a ainsi permis de fixer la concentration de SpNox à 1mg/ml pour les mesures de thermostabilité, dont les profils réalisés sur le monomère et le dimère de SpNox présentent une transition entre 50°C et 70°C correspondant à la dénaturation progressive de la protéine au cours de laquelle les tryptophanes sont exposés à l'environnement aqueux conduisant à l'augmentation du ratio de fluorescence 330nm/350nm (Fig.3.1.12). Cette comparaison révèle que le dimère présente un Tm de 55°C légèrement inférieur à celui du monomère (59°C) pouvant indiquer une perte de stabilité de l'état dimérique de SpNox.

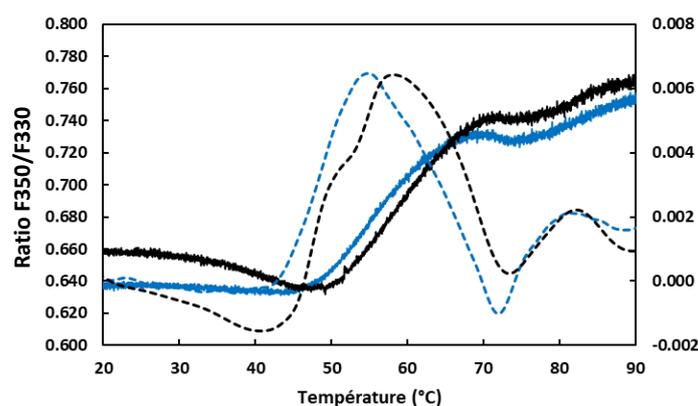


Fig.3.1.12 : Profils de dénaturation (Ratio F350/F330) mesurés sur les fractions monomériques et dimériques de SpNox. Les courbes de dénaturation (courbes pleines) ont été mesurées sur SpNox 1mg/ml à l'état monomérique (noire) et dimérique (bleue). La première dérivée du signal est tracée sur le même graphique (courbes pointillées).

B. Optimisation du détergent

La caractérisation structurale et fonctionnelle des protéines membranaires intégrales nécessite l'extraction préalable de celles-ci hors de la membrane impliquant la rupture des interactions hydrophobes entre les protéines d'intérêt et le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique. Cependant, hors d'un environnement lipidique, les protéines membranaires s'agrègent en raison de l'effet hydrophobe, et il est ainsi nécessaire d'éviter leur agrégation en les isolant de l'environnement aqueux à l'aide de molécules amphiphiles de détergents. Ceux-ci, tout en déstabilisant la bicouche lipidique, vont permettre le maintien de l'intégrité structurale de protéines membranaires. En effet, au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC), les molécules de détergent s'associent spontanément sous forme de micelles globulaires formant un assemblage isolant de l'environnement aqueux les patches hydrophobes des protéines. En raison de divers paramètres, tels que la charge ainsi que taille de la partie hydrophile ou hydrophobe influençant directement la solubilité et la stabilité des protéines membranaires, le choix du détergent constitue un élément essentiel pour les futures études structurales. En effet, des caractéristiques telles que la taille des micelles formées par le détergent peuvent également impacter la cristallisation des protéines membranaires, en perturbant le repliement natif de celles-ci ou en empêchant la formation de contacts cristallins en présence de micelles dont la taille serait trop importante.

L'identification d'un détergent préservant la structure et la fonction de la protéine est ainsi cruciale pour les études structurales, et l'étude de la thermostabilité de SpNox en présence de différents détergents de structures et de tailles différentes a été réalisée afin d'identifier le détergent le plus stabilisant parmi le DDM, le DMNG et le LMNG et permettant la solubilisation efficace de SpNox

(Fig.3.1.13.d). Le DDM (n-Dodecyl β -D-maltoside) constitue un détergent non chargé connu pour la propriété de celui-ci à préserver l'activité des protéines membranaires, et couramment utilisé pour la solubilisation de celles-ci.

L'émergence plus récente d'une famille de détergents amphiphiles à base de Maltose-Neopentyl Glycol, caractérisés par une architecture plus proche des lipides et ainsi de l'environnement natif, organisée autour un carbone central quaternaire permettant l'incorporation de deux queues hydrophobes ainsi que deux têtes polaires a démontré une stabilisation structurale supérieure favorisant la cristallisation des protéines membranaires. La liberté de flexibilité et l'orientation distincte des régions hydrophiles et lipophiles semble également conférer des propriétés différentes des détergents classiques.

Parmi ces molécules, le LMNG (Lauryl-Maltose-Neopentyl Glycol) est un détergent artificiel neutre correspondant à l'association de deux molécules de DDM. Il est donc composé de deux têtes et deux queues hydrophobes liées ensemble par un carbone central, dont la CMC est proche de $10\mu\text{M}$ et le nombre d'agrégation est compris entre 45 et 227. Il a été montré que ce détergent est très stabilisant pour les protéines membranaires, et permet une solubilisation efficace de SpNox. Cependant, il forme de grosses micelles, pouvant présenter un risque d'inactivation de la protéine et se révéler problématique pour la cristallisation du complexe protéine/détergent.

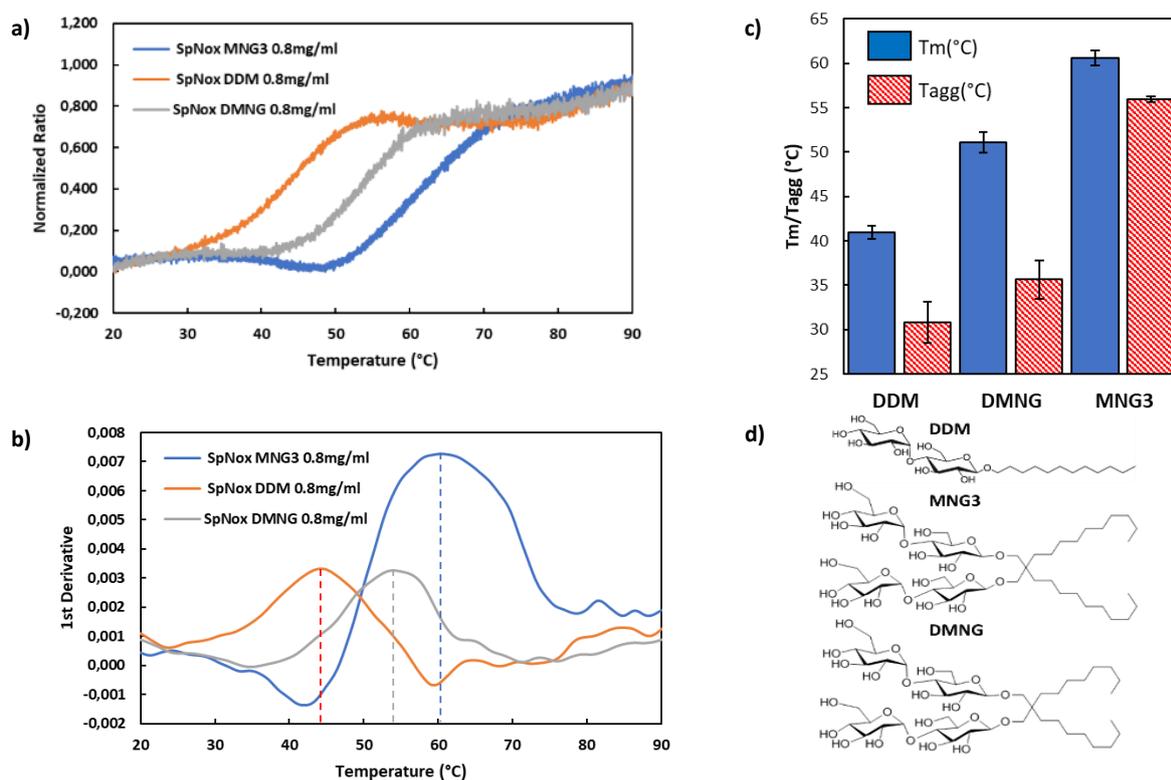


Fig.3.1.13 : Effet du détergent de solubilisation sur la thermostabilité de SpNox. Profils de dénaturation normalisés de SpNox (0.8mg/ml) en présence de 300mM NaCl (FAD⁻) obtenus pour différents détergents de solubilisation à une concentration comparable ($C_{\text{détergent}}=1.2 \times \text{CMC}$) (a). Dérivées premières des courbes de dénaturation mesurées en fonction du détergent de solubilisation (b). Histogramme des T_m (°C) et T_{ag} (°C) mesurés en fonction du détergent de solubilisation (c). Représentation des détergents testés lors de cette étude. Excepté pour le détergent, constituant la variable expérimentale, les mesures sont réalisées dans des conditions de composition identique au tampon de filtration sur gel.

Ainsi, le DMNG (Decyl Maltose Neopentyl Glycol), un détergent dont la structure est similaire au LMNG mais dont les chaînes aliphatiques sont réduites, forme des micelles de taille légèrement plus petite et pourrait ainsi constituer une alternative intéressante au LMNG.

Pour ces trois détergents, une concentration optimale de 1mg/ml pour la thermostabilité a été déterminé de manière identique à Fig.3.1.9. D'après les profils de dénaturation ainsi que les dérivées premières associées (Fig.3.1.13.a,b), la purification de SpNox effectuée en présence d'un détergent de la famille des MNG, dans les concentrations de détergents testées, conduit à une amélioration significative du T_m et de la température d'agrégation par rapport à la purification en DDM. La comparaison des courbes de ratio F350/F330 obtenues en présence des détergents de type MNG témoigne d'une augmentation supplémentaire de 9°C du T_m obtenue en LMNG par rapport au DMNG ainsi qu'un T_{ag} mesuré dans le cas du LMNG supérieur de 21°C par rapport au DMNG (Fig.3.1.13.c). Il apparaît ainsi que les chaînes plus courtes du DMNG ne semblent pas suffisantes pour stabiliser SpNox aussi efficacement que le LMNG. La réduction importante du T_{ag} en présence de DMNG par rapport au LMNG pourrait suggérer que les micelles de détergent formées par le DMNG soient trop petites pour masquer les régions hydrophobes de la protéine dans leur globalité, ce qui pourrait alors faciliter l'agrégation de celles-ci.

En conclusion, le LMNG semble le détergent le plus stabilisant pour SpNox et sera ainsi utilisé pour la réalisation des caractérisations structurales.

C. Optimisation des conditions de pH et de sels pour la conservation de SpNox

a. Optimisation de la stabilité

Les charges au sein des protéines peuvent être modulées selon l'environnement de celles-ci, notamment par des facteurs tels que le pH et la concentration en sels au sein du tampon, capables d'impacter les interactions entre les molécules et exerçant par conséquent une influence directe sur la stabilité de la protéine [4] ainsi que sur l'empilement cristallin.

La thermostabilité de SpNox a ainsi été caractérisée sur de larges gammes de pH et de concentration en sels. Les profils de thermostabilité mesurés à pH7 pour des concentrations croissantes en sels montrent une augmentation constante du T_m caractérisée par le décalage progressif de la courbe de dénaturation vers les températures plus élevées avec la concentration en sel (Fig.3.1.14.a).

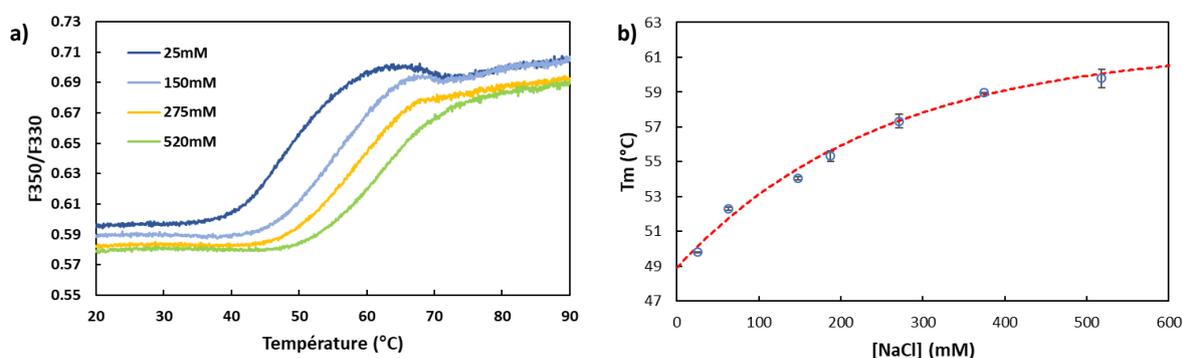


Fig.3.1.14 : Effet de la concentration en NaCl sur la thermostabilité de SpNox en LMNG. (a) Exemples d'évolution des courbes de dénaturations mesurées pour SpNox 1mg/ml à un pH fixe (pH7) en fonction de la concentration en NaCl. (b) L'évolution des T_m en fonction de la concentration en sel à pu être ajustée avec une courbe croissante exponentielle selon un coefficient de corrélation de 0.998. D'après cet ajustement, 70% du T_m maximum est atteint pour 300mM NaCl. Excepté pour la concentration en NaCl, constituant la variable, les mesures sont réalisées dans une condition expérimentale de composition identique correspondant au tampon de filtration sur gel.

L'augmentation du T_m en fonction de la concentration en sel a pu être ajustée avec une courbe exponentielle avec un coefficient de corrélation de 0.998 (Fig.3.1.14.b).

$$Tm([NaCl]) = Tm_{0M} + A \cdot \exp\left(-\frac{[NaCl]}{\tau}\right)$$

avec T_{m0M} , le T_m mesuré en absence de NaCl, A , le facteur de proportionnalité égal à l'amplitude entre le T_m minimal et le T_m maximal et τ , la constante d'augmentation du T_m en fonction du sel.

A partir de cet ajustement, il est possible de quantifier à partir de quelle concentration en sel le T_m est proche du T_m maximal. Ainsi il apparaît que pour une concentration proche de 300mM NaCl, le T_m atteint 70% du T_m maximum.

Il est établi que la force ionique exerce un impact significatif sur la stabilité des protéines, désigné par effet Hofmeister, en modifiant les interactions électrostatiques au sein du solvant aqueux permettant ainsi, en réduisant les régions accessibles par le solvant, d'isoler la protéine de l'environnement hydrophile [5]. Il a ainsi été montré que les ions mis en évidence par Hofmeister contribuaient par ces mécanismes à stabiliser les protéines. Les travaux de Hofmeister ont permis de répertorier et classer les ions en fonction de leur propriété de solubilisation permettant ainsi de distinguer les ions chaotropes, qui augmentent la solubilité des protéines pour des concentrations croissantes en sels (salting in), et les ions kosmotropes dont les capacités de solubilisation diminuent lorsque la concentration en sels augmente (salting out). Les ions Na^+ appartenant à la catégorie des ions chaotropes, les concentrations croissantes de NaCl favoriseraient la stabilité de SpNox en accord avec les résultats obtenus.

Les profils de dénaturation de SpNox, mesurés à 300mM NaCl sur une large gamme de pH s'étendant entre pH4 et pH9, démontrent une forte dépendance de la thermostabilité en fonction du pH (Fig.3.1.15.a).

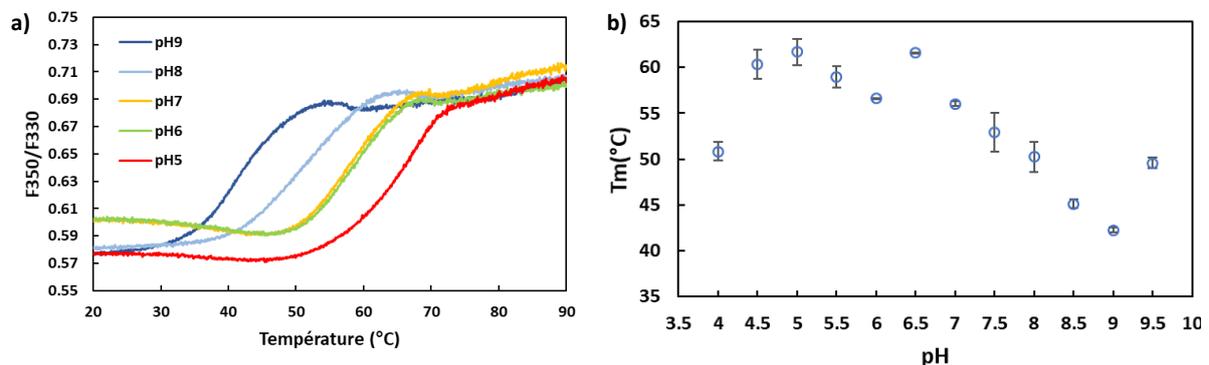


Fig.3.1.15: Effet du pH sur la thermostabilité de SpNox. (a) Exemples d'évolution des courbes de dénaturations mesurées pour SpNox 1mg/ml une concentration fixe de NaCl (300mM) en fonction du pH. (b) Evolution du T_m extrait pour une même concentration en NaCl (300mM) en fonction du pH. Seule la valeur du pH, dont la valeur est déterminée par l'utilisation de molécules tampon différentes, varie au sein des condition testées. Excepté pour le pH, constituant la variable, les mesures sont réalisées dans une condition expérimentale de composition identique correspondant au tampon de filtration sur gel.

En effet, l'évolution du T_m en fonction du pH (Fig.3.1.15.b) témoigne d'un optimum à pH5 avec un plateau de haute stabilité ($T_m > 58^\circ C$) pour des pH entre 4.5 et 6. En dehors de ce plateau, une chute de thermostabilité est observée pour les pH inférieurs à 4.5 tandis que le T_m décroît linéairement pour les pH > 6.5 . Un optimum local semble présent à pH6.5, cependant celui-ci pourrait également correspondre à un artefact de mesure engendré par une influence des molécules composant les tampons utilisés pour fixer les différents pH.

Des mesures à plusieurs pH (6 et 6.5) fixés par des molécules tampons distinctes pour une même valeur de pH ont ainsi été effectuées en présence de concentrations croissantes en NaCl afin de vérifier cette hypothèse (Fig.3.1.16). Un écart de T_m de $8^\circ C$ est ainsi apparu entre les mesures effectuées à pH 6.5

avec la protéine introduite dans un tampon composé d'acide citrique ou constitué de MES pour l'ensemble de la gamme de sels testée.

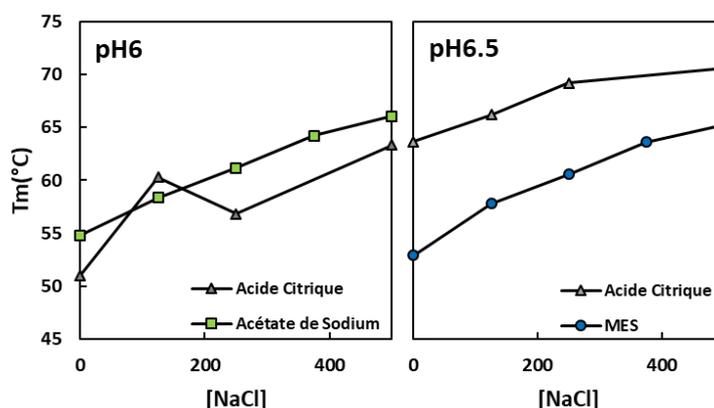


Fig.3.1.16 : Effet du tampon sur la thermostabilité de SpNox à pH fixe sur une gamme de concentration en NaCl. Les courbes d'évolution du Tm en fonction de la concentration en sels à pH6 et pH6.5 ont été tracées pour deux molécules tampons différentes. Au sein des conditions expérimentales, l'acétate de Sodium ou l'acide citrique ont été utilisés pour définir le pH à 6 et l'acide citrique et le MES ont été utilisés afin de fixer le pH à 6.5.

En accord avec ces observations, afin de s'assurer de la validité des conclusions apportées par les expériences précédentes permettant la détermination d'un pH optimal favorisant la thermostabilité de SpNox et de s'affranchir d'éventuels biais engendrés par la molécule tampon utilisée pour fixer le pH, des mesures similaires ont été reproduites en réalisant la gamme de pH à l'aide d'un tampon universel composé d'un mélange en proportions variables de deux molécules tampon ajustées selon la valeur de pH à atteindre (Fig.3.1.17.a).

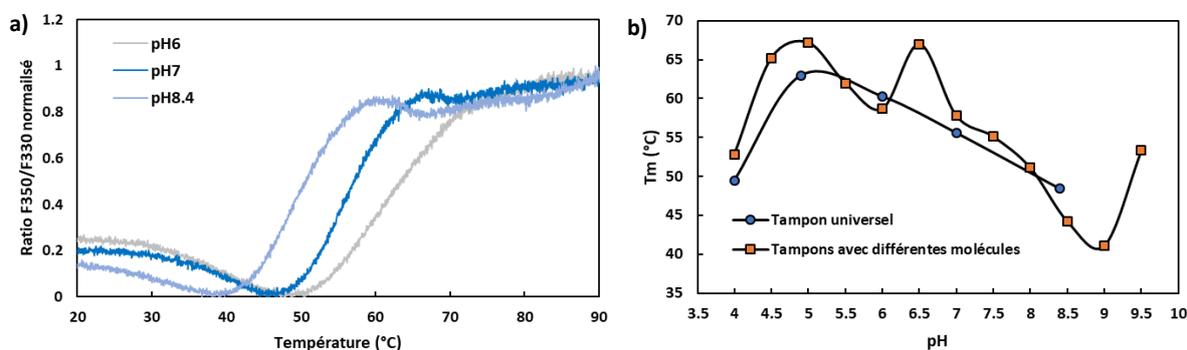


Fig.3.1.17: Effet du pH fixé par tampon universel sur la thermostabilité de SpNox. (a) Profils de dénaturation normalisés obtenus pour différents pH fixés à l'aide d'un tampon universel Na_2HPO_4 /Acide citrique (Tampon de Mc Ivaine). (b) La courbe d'évolution des Tm en fonction du pH mesuré dans le cas d'un tampon universel, permettant de couvrir toutes les valeurs de pH, est superposée à la courbe dont les valeurs de la gamme de pH ont été fixées par différentes molécules tampons. Excepté pour le pH, les mesures sont réalisées dans une condition expérimentale de composition identique au tampon de filtration sur gel.

Ainsi, quel que soit la valeur de pH au sein de la gamme, la composition moléculaire du tampon est inchangée. On remarque alors que les profils de fusions restent similaires à ceux obtenus lors de l'expérience précédente, et la courbe d'évolution du Tm en fonction du pH se superpose à la courbe initiale (Fig.3.1.17.b) à l'exception de l'optimum local à pH6.5, confirmant ainsi la présence d'un plateau de stabilité de SpNox entre pH4.5 et pH6. En comparaison avec une étude menée sur 310 protéines, révélant que la distribution des pH optimum pour la stabilité suit une courbe gaussienne centrée autour d'une valeur de pH à 7 [6], le décalage de l'optimum de SpNox vers des pH plus faibles pourrait être liée à une adaptation de la protéine en accord avec son rôle physiologique provoquant une acidification du milieu cytosolique lors de la production de ROS par les NOX.

La gamme de concentration en sel a ensuite été reproduite pour chacune des valeurs de pH préalablement testées et les mesures de T_m associées ont été représentées à l'aide d'un diagramme à deux dimensions afin de faciliter la visualisation des données. L'analyse de l'influence combinée du pH et de la concentration en NaCl sur la thermostabilité de SpNox (Fig.3.1.18) met en évidence l'existence d'un plateau de stabilité dont le T_m est supérieur à 60°C pour des valeurs de pH inférieures à 7 et une concentration en sel supérieure à 200mM.

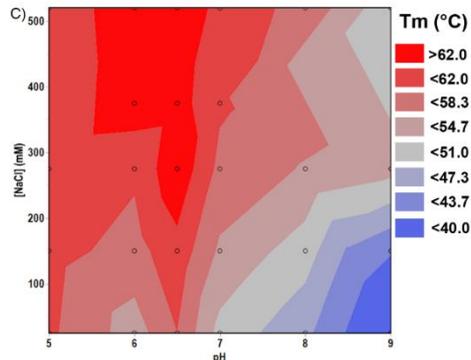


Fig.3.1.18: Diagramme 2D de l'évolution du T_m en fonction du pH et de la concentration en sel. Les régions représentées en rouge correspondent au T_m les plus élevés et les zones en bleu correspondent aux T_m les plus faibles. Les marqueurs (o) représentent les points expérimentaux mesurés pour discrétiser l'espace pH/NaCl et les surfaces d'isothermostabilité sont calculées par le logiciel JMP par interpolation linéaire entre les T_m acquis pour les différents points expérimentaux.

3. Optimisation de l'activité

Afin d'identifier une condition de tampon optimale pour la conservation de la protéine en vue des études structurales combinant simultanément stabilité et activité enzymatique, l'activité de SpNox a ensuite été caractérisée selon des conditions en sel et en pH similaires aux gammes précédentes (Fig.3.1.19.a). L'activité enzymatique de SpNox correspond au transfert d'électrons successivement du NADPH, constituant le substrat cytosolique, au cofacteur FAD puis aux groupements hémiques de la protéine jusqu'à atteindre l'oxygène moléculaire (O_2) conduisant ainsi à la production d'anion superoxyde. L'activité de SpNox peut être évaluée par suivi spectrophotométrique de l'absorbance à 550nm correspondant à la réduction du cytochrome c, utilisé en tant que molécule rapportrice, par l'anion superoxyde au cours du temps.

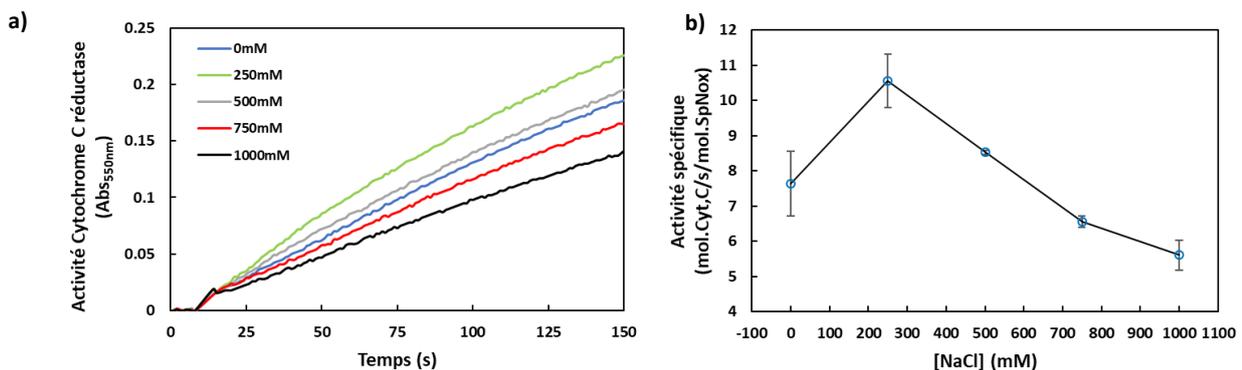


Fig.3.1.19: Effet de la concentration en NaCl sur l'activité cytochrome c réductase de SpNox.(a) Suivi de la réduction du cytochrome c en fonction du temps par mesure d'absorbance à 550nm pour différentes concentrations en NaCl. (b) Evolution des activités spécifiques en fonction de la concentration en sel. Excepté pour le NaCl, les mesures sont réalisées dans une condition expérimentale de composition identique au tampon de filtration sur gel.

Contrairement à la thermostabilité de SpNox qui augmente avec les concentrations croissantes de NaCl, l'activité spécifique mesurée à pH7 en fonction de la concentration en sel montre un clair

optimum pour une concentration en NaCl de 250mM et une perte d'activité pour des concentrations encadrant ce maximum (Fig.3.1.19.b).

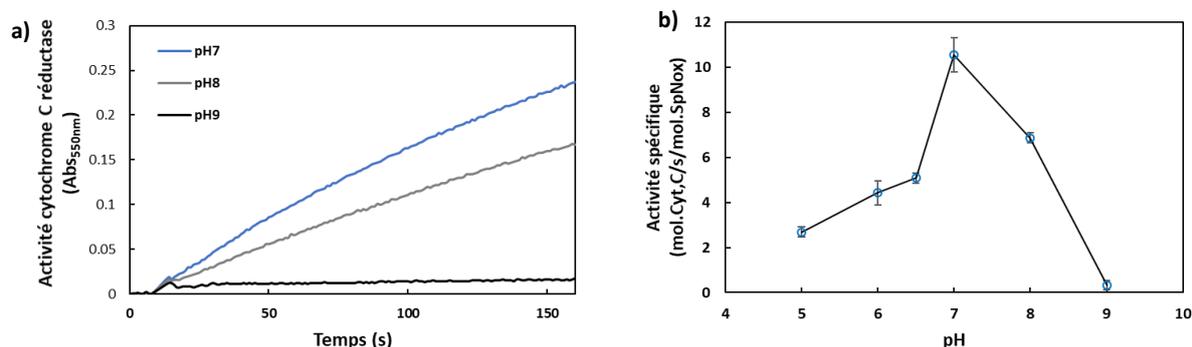


Fig.3.1.20 : Effet du pH sur l'activité cytochrome c réductase de SpNox.(a) Suivi de la réduction du cytochrome c en fonction du temps par mesure d'absorbance à 550nm pour différents pH. (b) Evolution des activités spécifiques en fonction du pH. Excepté pour le pH, les mesures sont réalisées dans une condition expérimentale de composition identique au tampon de filtration sur gel.

De même, l'activité spécifique de SpNox présente également une forte dépendance en fonction du pH avec un net optimum observé à pH7 (Fig.3.1.20.a). En revanche pour des pH inférieurs à 7, l'activité spécifique est inférieure à 50% de l'activité maximum (Fig.3.1.20.b). Une telle réduction de l'activité enzymatique provoquée par la diminution du pH du milieu a également été reportée dans une étude de l'activité NADPH oxydase au sein de cellules neuronales, et pourrait ainsi correspondre à un mécanisme de régulation permettant de limiter la toxicité engendrée par une surproduction de ROS [7].

De manière similaire à l'optimisation de la thermostabilité, un diagramme à deux dimensions a été réalisé en mesurant l'activité spécifique pour les gammes de pH et de concentration en NaCl (Fig.3.1.21). Celui-ci permet la mise en évidence d'un optimum d'activité cytochrome c réductase de SpNox à pH7 et 250mM NaCl avec une décroissance progressive dès lors que les conditions s'éloignent du maximum.

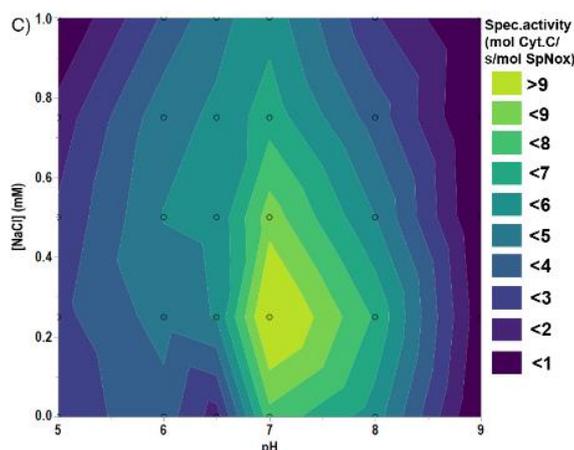


Fig.3.1.21: Diagramme 2D de l'évolution de l'activité cytochrome c réductase en fonction du pH et de la concentration en sel. Les régions en jaune correspondent aux régions de plus fortes activités spécifiques et les zones en bleu correspondent aux faibles activités. Les points représentent les points expérimentaux réalisés pour dicrétiser l'espace des pH et des NaCl les courbes d'isocativité sont calculés par le logiciel JMP par interpolation linéaire entre les activités mesurées pour les différents points expérimentaux.

Afin de déterminer un optimum de pH et de concentration en sel pour lequel SpNox associe une haute stabilité ainsi qu'une forte activité, un graphique à trois dimensions a été réalisé en combinant les figures 3.1.18 et 3.1.21 sur un graphique 3D avec l'activité spécifique reportée selon l'axe z et le Tm représenté en surface selon une échelle de couleur (Fig.3.1.22). Il est ainsi possible d'identifier une

condition à pH7 et 300mM NaCl pour laquelle la protéine présente un Tm de 58°C et une activité de 10mol_{Cytc réduit}/mol_{Spnox}/s et dont la composition sera ainsi utilisée au cours des études ultérieures.

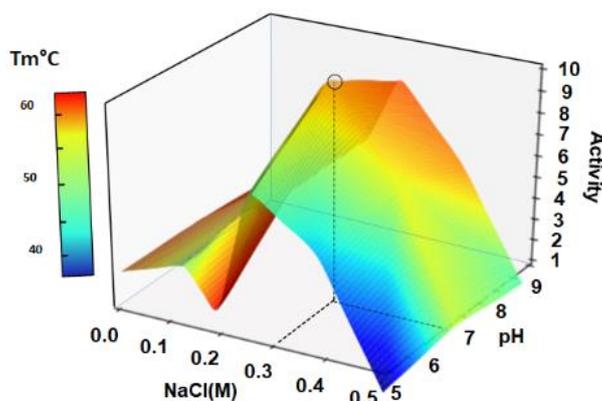


Fig.3.1.22: Diagramme 3D de l'évolution de la thermostabilité et de l'activité cytochrome c réductase en fonction du pH et de la concentration en sel. L'activité spécifique est représentée sur l'axe z et la thermostabilité est représentée en couleur. Les régions en rouge correspondent aux régions de Tm les plus élevées et les zones en bleu correspondent aux Tm les plus faibles

4. Influence du FAD

En conditions physiologiques, un grand nombre d'enzymes s'associe avec des ligands et des cofacteurs afin d'assurer leur activité catalytique. Il a été montré que la plupart des protéines étaient généralement stabilisées par la complexation avec leur ligand/cofacteur, et que celle-ci participait ainsi à faciliter la cristallisation des enzymes et donc leur caractérisation structurale [8]. De plus, certaines protéines se sont révélées incapables de cristalliser en absence de leur cofacteur, démontrant ainsi que leur présence pouvait être requise à l'établissement de contacts cristallins entre les protéines dont l'arrangement périodique est nécessaire à la croissance de cristaux permettant une diffraction à haute résolution [9]. La supplémentation en FAD, indispensable lors des tests d'activité cytochrome c réductase de SpNox indique une labilité du cofacteur au sein de la protéine, et suggère que l'ajout de FAD au cours des étapes de purification de SpNox pourrait participer à la stabilisation de la protéine.

A. Courbe de ratio différentiel obtenu par nanoDSF

L'étude de l'influence du FAD sur la stabilité de SpNox a donc été réalisée en comparant la thermostabilité de la protéine purifiée en absence du cofacteur FAD puis supplémentée ou non de FAD (10µM) au moment de l'expérience. Les courbes de ratio F350/F330 obtenues dans ces deux conditions présentent des transitions de dénaturation similaires suggérant une température de fusion semblable des deux échantillons (Fig.3.1.23.a). Cependant, une différence majeure entre les deux profils peut être observée aux niveaux des basses températures. En effet, en absence de FAD, le ratio de fluorescence F350/330 croît de façon monotone à partir d'une valeur initiale de 0.6, tandis qu'en présence de FAD au sein de SpNox, l'obtention d'un plateau à 0.75 est observée pour les basses températures, suivie d'une 1^{ère} transition décroissante, puis présente une transition de dénaturation similaire à celle observée sur la mesure réalisée en absence FAD. Les contrôles négatifs, réalisés en absence de protéine et en absence ou en présence FAD ne présentent aucune différence, confirmant ainsi que la transition constatée à basse température est une conséquence de l'interaction de SpNox avec son cofacteur FAD. Afin de mettre en évidence la différence entre les deux profils, une courbe différentielle des ratio F350/F330 en absence ou en présence de FAD a été tracée grâce à la soustraction de la mesure nanoDSF en absence FAD à la mesure en présence FAD, et permet d'identifier la présence d'une transition additionnelle à 45°C due à la présence de FAD (Fig.3.1.23.b).

Enfin la comparaison des courbes de 1^{ère} dérivées obtenues en présence et en absence du cofacteur confirme que les T_m des deux échantillons sont identiques et souligne également une transition supplémentaire aux alentours de 45°C lors de l'ajout du FAD (Fig.3.1.23.c).

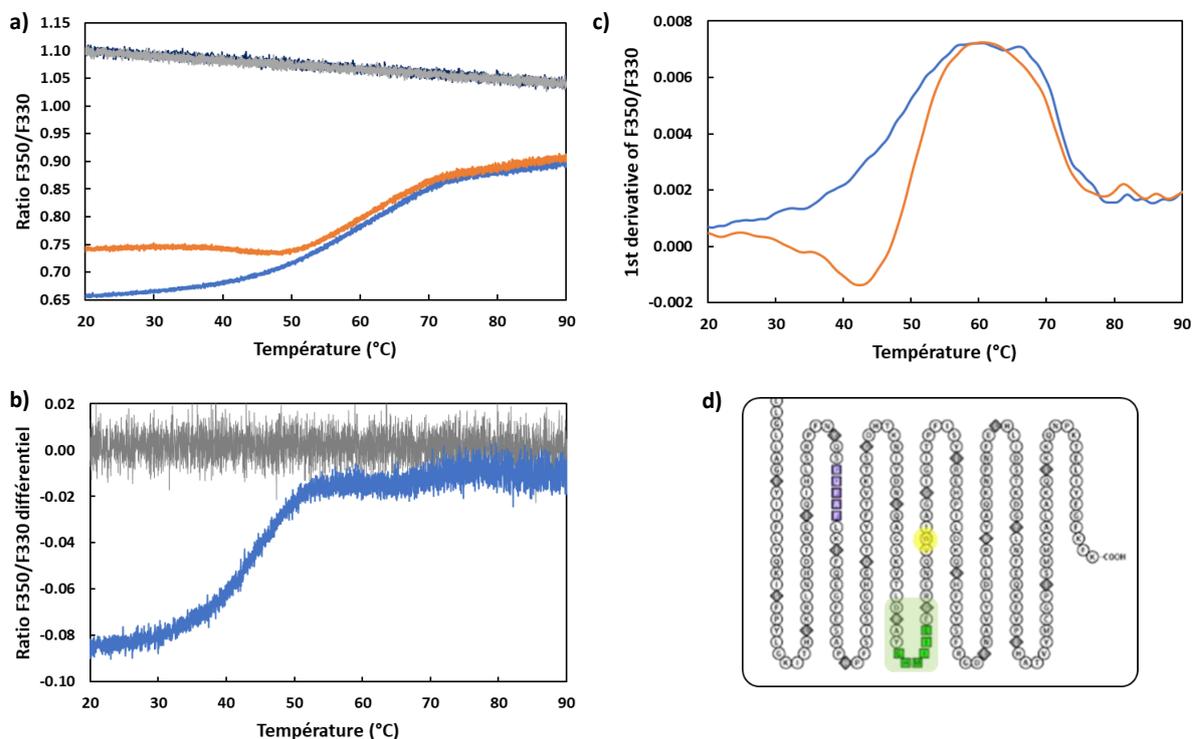


Fig.3.1.23: Effet de l'ajout de FAD sur la thermostabilité de SpNox. (a) Les profils de dénaturation sont mesurés sur SpNox (1mg/ml) avec ajout de FAD (10 μ M) (orange) ou au sein du tampon de filtration sur gel en absence de FAD (bleu). Les transitions des deux protéines sont identiques, en revanche la présence de FAD conduit à une déformation du profil au niveau des faibles températures. (b) Courbes différentielles Ratio(FAD⁺)-Ratio(FAD⁻) mesurés en présence de SpNox (bleu) ou sur un contrôle négatif en absence de protéine (gris) (c). Courbes de 1^{ères} dérivées confirmant que les T_m sont identiques avec ou sans FAD et mettant en évidence la présence d'une transition entre 40 et 45°C lorsque le FAD est ajouté lors de la purification (c). Représentation schématique de la séquence d'acides aminés du domaine DH. ● représente l'unique tryptophane présent dans le domaine DH de SpNox et représente le domaine de liaison au FAD (d).

La valeur du ratio F350/F330 étant directement reliée à l'environnement des résidus tryptophanes au sein de la protéine, les différences initiales de profils observées entre les échantillons avec et sans ajout de FAD pourraient ainsi indiquer une modification de l'environnement autour des résidus tryptophanes de SpNox résultant d'un changement conformationnel de la protéine suite à la liaison du FAD au niveau du domaine déshydrogénase.

Ce changement conformationnel pourrait ainsi impacter l'environnement du résidu W289 présent au sein du domaine DH. Cependant la position de ce résidu au sein du site de liaison du NADPH laisse suggérer que l'impact du FAD sur ce tryptophane soit peu probable (Fig.3.1.23.d). En revanche, un impact du FAD sur le W125 du TM pourrait être envisageable d'après les études structurales réalisées dans la suite de ce manuscrit.

De plus la transition additionnelle observée sur le ratio en présence de FAD pourrait correspondre à la perte du cofacteur par SpNox survenant en cours de dénaturation, autour de 45°C et conduisant à l'obtention d'un profil correspondant à nouveau à une protéine sans FAD, en accord avec la superposition des courbes de dénaturation à partir de 50°C.

B. Etude par ThermoFAD

Bien que les deux domaines de la protéine comportent des résidus tryptophanes (Fig.3.1.7), le profil de dénaturation mesurée à l'aide du nanoDSF dans la condition identifiée comme optimale, ne permet pas d'observer une dénaturation indépendante des deux domaines.

Ainsi, afin de vérifier l'hypothèse que la transition observée à basse température dans les profils de nanoDSF mesurés en présence de FAD soit due à une dénaturation de la protéine à proximité du cofacteur, une étude a été réalisée en employant une méthode complémentaire au nanoDSF, le thermoFAD, basée sur la fluorescence intrinsèque du cofacteur FAD, et ainsi particulièrement adaptée à l'étude des flavoprotéines en permettant de suivre la dénaturation locale de la protéine au niveau du site de liaison du FAD. Après optimisation de la concentration de protéine à utiliser avec cette technique, un profil de dénaturation a été obtenu avec 3mg/ml de protéine purifiée en présence de FAD. La courbe présente un plateau stable à faible température suivi d'une transition en 40 et 55° puis d'une décroissance à haute température (Fig.3.1.24.a). La transition observée à 45°C traduit une dénaturation dans la région du site de liaison au FAD dont le T_m semble similaire au T_m de la transition mise en évidence par le profil différentiel des mesures nanoDSF. La comparaison de la mesure de la fluorescence du FAD à la courbe nanoDSF différentielle démontre que les transitions sont relativement proches (Fig.3.1.24.b) du site de liaison du FAD. Ainsi l'ajout du FAD ne semble pas modifier la thermostabilité de SpNox car il semblerait que le cofacteur se délie de la protéine pour une température inférieure à celle de la dénaturation de l'enzyme.

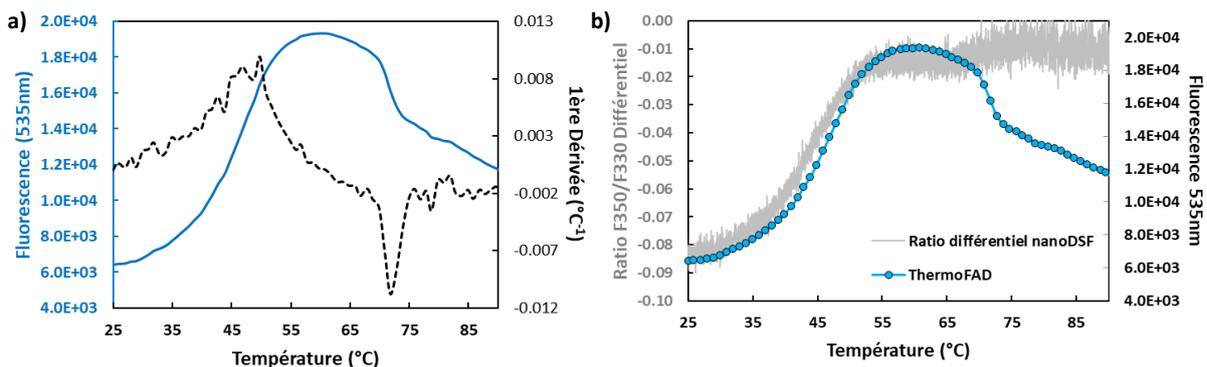


Fig.3.1.24: Thermostabilité de SpNox caractérisée par ThermoFAD. (a) Le profil de dénaturation (trait plein) mesurée sur SpNox (4mg/ml) avec ajout de FAD (10 μ M) et la courbe de 1^{ère} dérivée (pointillés), également représentée indique un T_m mesuré par ThermoFAD de 47°C. (b) La courbe de dénaturation mesurée par ThermoFAD (o) se superpose quasiment à la courbe de ratio différentielle obtenue par mesure nanoDSF (trait plein).

5. Conclusion

L'optimisation des paramètres expérimentaux pour l'étude de thermostabilité par nanoDSF et le développement d'un modèle permettant une compréhension avancée des profils de thermostabilité, ont permis la réalisation d'un criblage systématique des conditions expérimentales optimales en termes de détergent, sel, pH afin de définir une région de haute stabilité. Ces expériences, couplées à l'évaluation de l'activité de SpNox dans des conditions expérimentales similaires, ont permis par analogie, l'extraction d'une zone présentant une forte activité, et ont finalement conduit à la détermination des paramètres associant un optimal d'activité et de thermostabilité afin d'adapter les conditions de purification et conservation de la protéine pour favoriser l'intégrité de SpNox en amont de son étude structurale.

De plus, des mesures de thermostabilité en présence du cofacteur ont montré que l'interaction de celui-ci avec son site de liaison ne modifiait pas la stabilité de la protéine. En revanche, les études réalisées en couplant les approches complémentaires, exploitant respectivement la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophanes (nanoDSF) ou du cofacteur FAD (ThermoFAD) de la protéine, permettant dans le cas de SpNox, d'observer respectivement la dénaturation à l'échelle de la protéine entière ou d'un seul des domaine (DH) et démontrant l'intérêt de telles méthodes afin de caractériser les changements conformationnels intervenant lors de la perte du FAD lors de l'augmentation de la température.

2

Etude cristallographique de SpNox entière

La caractérisation de l'activité et thermostabilité de SpNox a permis de définir des paramètres de purification favorisant le maintien de la protéine dans des conditions optimales de pureté, d'homogénéité, de stabilité et d'activité afin de disposer d'un échantillon dont la qualité est compatible avec les études structurales.

1. Criblage HTX

A. Cristallogenèse

La cristallographie aux rayons X constitue une technique permettant d'accéder aux informations structurales à haute résolution, ainsi des essais initiaux de cristallogenèse par diffusion de vapeur ont été effectués sur la plateforme de cristallisation automatique du HTX lab permettant le criblage simultané d'un grand nombre de conditions. Les plaques de criblages standards rassemblant chacune un ensemble de 96 conditions de cristallisation récurrentes ayant préalablement abouti à la résolution de la structure d'un grand nombre de protéines solubles ou membranaires (Tab.3.2.1), dont la capacité de cristallogenèse a été testée sur la protéine SpNox entière purifiée en présence de FAD afin de rechercher des conditions initiales prometteuses pour l'obtention de cristaux.

Wizard I + II Rikaku	Matrice aléatoire pour la cristallisation de macromolécules biologiques
Classics-Suite_qiagen	Inclut les composants les plus populaires dans la cristallographie des protéines d'après les travaux de Jancarik et Kim [10]
Mem_Meso_MD	Criblage semi-systématique couvrant une gamme de pH, de précipitants (PEG) et de sel. Données sur les conditions extraites des structures cristallines de GPCR.
MemGold_MD	Basé sur des données de conditions de cristallisation extraites de la banque de données sur les protéines et aborde la diversité des protéines membranaires étudiées, de types alpha et bêta. Il couvre une gamme de pH, de PEG et d'additifs au sel.
MemGold2_MD	Conditions de cristallisation des protéines membranaires alpha-hélicoïdales les plus récentes, particulièrement adaptées aux protéines membranaires procaryotes et eucaryotes alpha-hélicoïdales
MemStartSys_MD	Point de départ optimal pour le criblage et l'optimisation des protéines membranaires alpha-hélicoïdales, basé sur les réactifs généralement utilisés dans le laboratoire du professeur S. Iwata

Tab.3.2.1 : Résumé des plaques de criblages standards utilisées sur la plateforme automatique du HTX.

Ces premiers tests ont conduit à la cristallisation de SpNox dans quinze conditions présentes parmi les criblages initiaux MemGold_MD et MemGold2_MD, élaborés spécifiquement afin de regrouper des conditions généralement adaptées à la cristallisation de diverses protéines membranaires, ainsi que sur la plaque standard Wizard I + II Rikaku constituant une matrice de conditions aléatoire permettant d'explorer l'effet d'un grand nombre de paramètres indépendants. Les cristaux obtenus présentent une couleur rouge s'intensifiant avec la taille de ceux-ci, semblant ainsi témoigner de la présence d'hèmes et donc confirmer l'origine protéique de ces structures hexagonales (Fig.3.2.1).

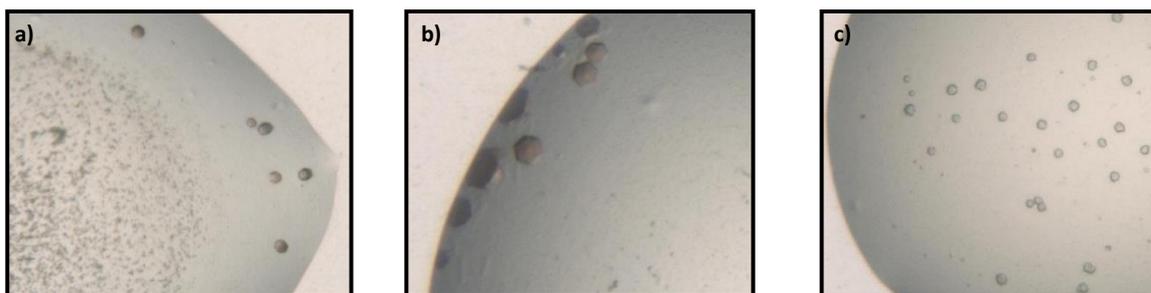


Fig.3.2.1 : Observation des premiers cristaux de SpNox obtenus lors de ce projet de thèse sur la plateforme de cristallisation automatique à l'aide des plaques de criblages standards ou adaptées pour les protéines membranaires. Cristaux obtenus avec [SpNox] = 8mg/ml et (a) 30% PEG400, 0.1M Hepes pH7, NaCl 0.2M, (b) 30% PEG300, NaCl 0.1M, Li₂SO₄ 0.1M, MES pH6, (c) 14% PEG500 MME, CaCl 0.005, pH6.

En revanche la taille de ces premiers cristaux, dont les arêtes sont parfois peu définies, reste relativement faible.

B. Analyse des hits de cristallisation

Ainsi afin de restreindre les diverses pistes obtenues à une condition adéquate autour de laquelle réaliser un premier affinement, les compositions des différentes solutions de cristallisation ont été analysées en étudiant le pourcentage de « hits² » obtenus en fonction de la composition en pH et des différents types de précipitants et de sels présents dans la solution (Fig.3.2.2).

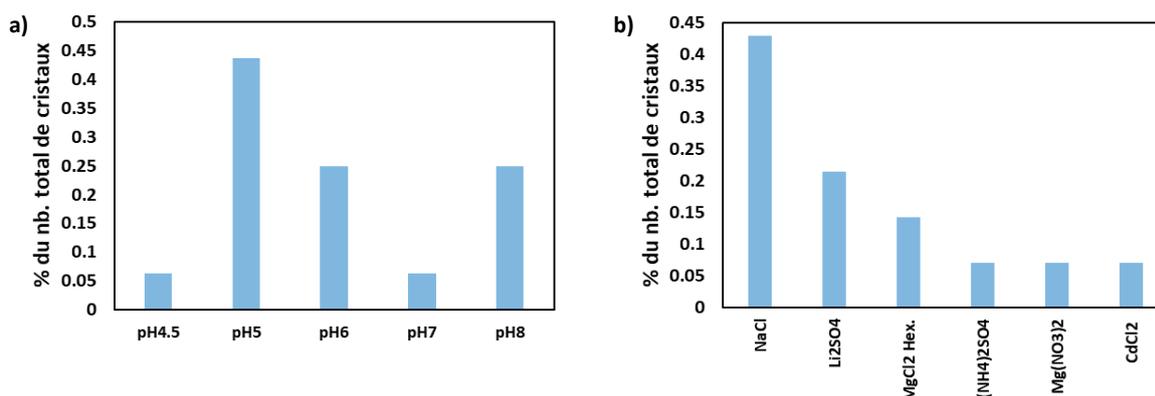


Fig.3.2.2 : Analyse des conditions de sels et de pH conduisant à des cristaux de SpNox. (a) Pourcentages de cristaux obtenus en fonction du pH de la solution de puits. Les pH testés n'ayant conduit à aucun cristal ne sont pas répertoriés. (b) Pourcentages de cristaux obtenus en fonction des sels utilisés dans la solution de puits. Les sels testés n'ayant conduit à aucun cristal ne sont pas répertoriés.

On remarque ainsi que 70% des cristaux ont été obtenus pour un pH compris entre 5 et 6 (Fig.3.2.2.a), en corrélation avec le plateau de thermostabilité également obtenus à ces pH, indiquant que l'augmentation de la stabilité pourrait être à l'origine du taux plus élevé de cristallisation de SpNox dans ces conditions. L'étude de l'influence de la composition en sels au sein de la solution de cristallisation a montré que la présence indépendante de NaCl ainsi que de Li₂SO₄ a conduit à l'obtention de la majorité des hits avec respectivement 43% et 20% des cristaux obtenus (Fig.3.2.2.b). Enfin 93% des cristaux ont été obtenus en présence de polyéthylènes glycols de poids moléculaire compris entre 200 et 500 g/mol (Fig.3.2.3).

² Le terme « hit » désigne une condition permettant à l'obtention de cristaux.

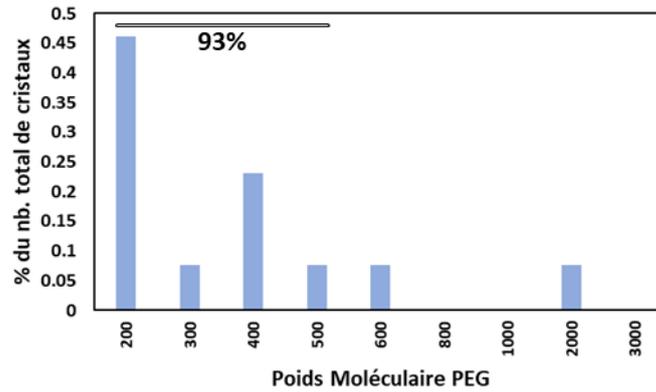


Fig.3.2.3 : Analyse des poids moléculaire de PEG conduisant à des cristaux de SpNox. Pourcentages de cristaux obtenus en fonction des poids moléculaire de PEG utilisés dans la solution de puits.

C. Plaques de criblage affinées

A partir de ces observations, des plaques d'affinement ont été développées afin de tester différentes gammes de concentrations de NaCl et de Li_2SO_4 en proportions variables, pour différents pourcentages de précipitant (PEG300). En effet, selon des critères basés sur l'aspect des cristaux, un PEG de poids moléculaire intermédiaire (PEG300), conduisant à l'obtention des cristaux les plus gros et les mieux définis et ainsi les plus prometteurs (Fig.3.2.3), a ainsi été sélectionné pour la réalisation de l'affinement. De plus en raison de la diminution significative de l'activité de SpNox constatée entre pH7 et pH5 (Fig.3.1.19), le pH des plaques d'affinement a été fixé à pH6 afin de conserver une protéine relativement fonctionnelle tout en maximisant les chances de cristallisation.

Afin de déterminer la concentration en protéine optimale pour l'obtention de cristaux, un test initial a été réalisé avec une concentration arbitraire de protéine de 9mg/ml mélangée au sein de la goutte de cristallisation selon trois ratio protéine/solution de puits afin de moduler l'état de sursaturation de la goutte après équilibration, en influençant artificiellement les concentrations initiales de protéines et précipitant ainsi que la concentration finale de protéine.

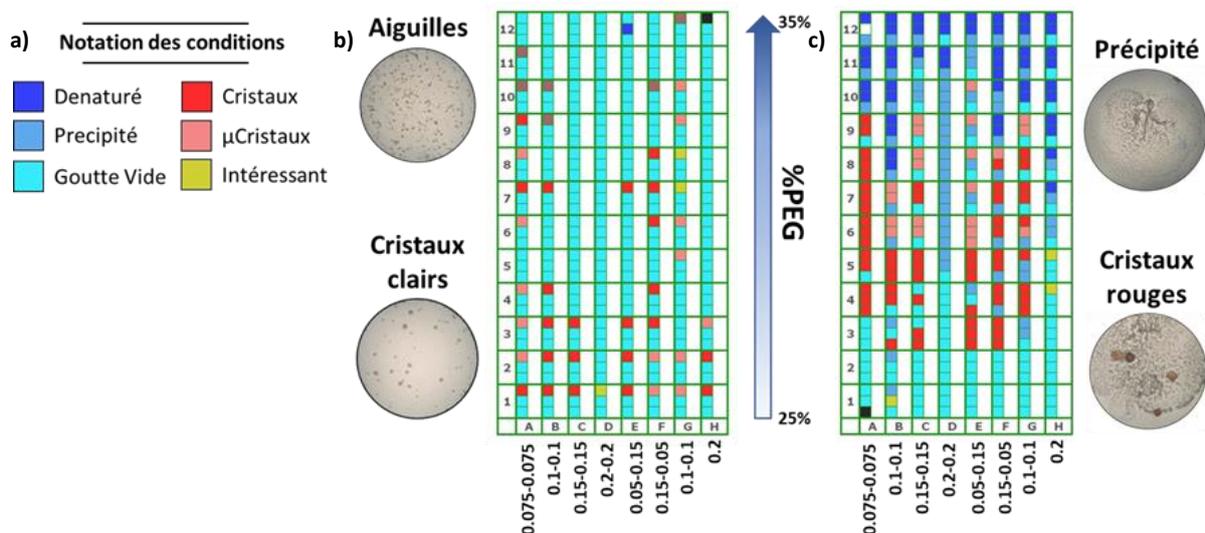


Fig.3.2.4 : Analyse des plaques de criblage d'affinement NaCl/Li₂SO₄/pH réalisés pour différents ratio protéine/puits ou différentes concentrations de protéines. (a) Légende des couleurs utilisées pour la notation des puits. Plaque réalisée à pH6 avec une gamme de PEG300 allant de 25% à 35% et différents concentrations de NaCl et Li₂SO₄ pour des concentrations de SpNox de 9mg/ml avec les ratios 1:3, 1:1 et 3:1 (b) ou 8-13-19mg/ml avec un ratio 1:1 (c). Pour chaque condition de PEG et de sel, les puits respectivement inférieurs correspondent à un ratio 1:3 (b) ou [SpNox]=8mg/ml (c), centraux à un ratio 1:1 (b) ou [SpNox]=13mg/ml (c), ou supérieurs à un ratio 3:1 (b) ou [SpNox]=19mg/ml (c). Les inserts correspondent à des observations représentatives des gouttes à pourcentages de PEG faibles et élevés.

L'observation de cette plaque de criblage révèle la présence d'un grand nombre de cristaux (identifiés en rouge sur la figure 3.2.4.b) confirmant ainsi que les conditions en sels et en précipitant sélectionnées favorisent la cristallisation de SpNox.

L'analyse indique une influence de la concentration en précipitant sur la taille et la forme des cristaux, avec l'obtention de petits cristaux clairs en présence d'un faible pourcentage de précipitant, et d'aiguilles plus petites et plus nombreuses pour des concentrations en PEG supérieures, en accord avec le diagramme de phase. De même, la présence de sel en concentrations trop élevées, combinée à l'effet du PEG, semble également exercer un effet précipitant en réduisant l'apparition de cristaux. Enfin, seuls les puits dont le ratio correspond à un volume de protéine triple par rapport au volume de solution de puits ont conduit à l'obtention de cristaux, autorisant un plus grand déplacement au sein de la zone de nucléation du diagramme de phase. Ils ont conduit à la croissance de monocristaux, suggérant ainsi que l'augmentation de la concentration en protéine pour la réalisation des plaques ultérieures pourrait aboutir à un nombre de hits plus important.

Ces hits (Fig.3.2.5.a) ont finalement été testés sur la ligne BM30 de l'ESRF afin d'évaluer leur qualité de diffraction aux rayons X, et seul un faible nombre de cristaux ont démontré un pouvoir diffractant avec un minimum autour de 11.3Å (Fig.3.2.5.b).

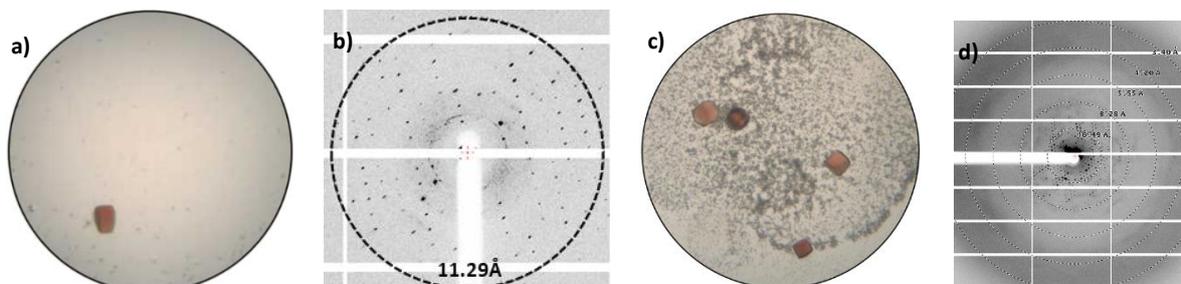


Fig.3.2.5 : Observations à J+5 de cristaux obtenus sur les plaques de criblages présentés en Fig.3.2.4.b et c et présentant les meilleurs niveaux de diffractions. Cristaux de SpNox obtenus à 9mg/ml de protéine, 26% PEG300 0.2M NaCl pH6 (a) ou 19mg/ml de protéine, 28% PEG300 0.05M Li₂SO₄ 0.15M NaCl pH6 (c). Ces cristaux ont été testés sur la ligne BM30 de l'ESRF afin d'obtenir respectivement les clichés de diffraction présentant une limite de diffraction de 11.29Å (b) et 9Å (d).

En accord avec les résultats précédents de nouveaux tests de cristallisation ont été réalisés avec 9mg/ml, 13mg/ml et 19mg/ml de protéines afin d'étudier l'influence de la concentration en protéine sur la cristallogénèse (Fig.3.2.4.c). L'analyse permet d'observer une dépendance des hits de cristallisation en fonction des concentrations en sels et en précipitant similaire à la plaque précédente. De plus les hautes concentrations de protéine semblent avoir conduit à une augmentation du taux de cristallisation, avec des cristaux de tailles supérieures et plus rouges que précédemment. En revanche les pourcentages les plus élevés de PEG ont entraîné la précipitation ou la dénaturation de la protéine, dont la concentration est trop élevée pour cristalliser en présence de tels pourcentages de précipitants. La caractérisation par rayons X de ces nouveaux cristaux a révélé une amélioration du pouvoir de diffraction avec une limite de résolution de 9Å (Fig.3.2.5.c et d) pour les meilleures conditions. Les clichés de diffraction ont également mis en évidence une dépendance importante de la qualité de diffraction à la taille des cristaux.

L'amélioration de la qualité de diffraction a notamment permis de déterminer la maille élémentaire P6₂₂₂ du cristal dont l'axe de symétrie d'ordre six (Fig.3.2.6) est en accord avec la forme hexagonale des cristaux, et les paramètres de maille suivants (Tab.3.2.2) :

a (nm)	b (nm)	c (nm)	$\alpha(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$
144.7	145.3	153.2	90	120

Tab.3.2.2 : Caractérisation de la maille élémentaire d'un cristal hexagonal de SpNox.

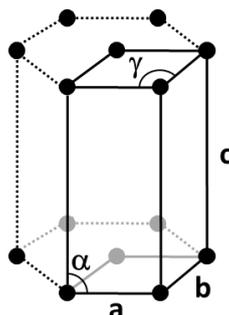


Fig.3.2.6 : Représentation de la maille élémentaire hexagonale représentative des groupes d'espaces P6

D. Construction d'un modèle linéaire pour prédire la cristallisation de SpNox

Afin de favoriser la croissance de cristaux de grandes tailles permettant potentiellement d'abaisser la limite de résolution, de nouveaux affinements ont été réalisés manuellement en plaques 24 puits. Ces affinements manuels autorisent généralement un meilleur contrôle de la croissance cristalline mais contraignent à cribler autour d'un nombre restreint de conditions. Dans le but d'identifier une condition adéquate autour de laquelle réaliser ces tests, une analyse a été menée sur l'ensemble des conditions testés au robot sur les plaques d'affinement.

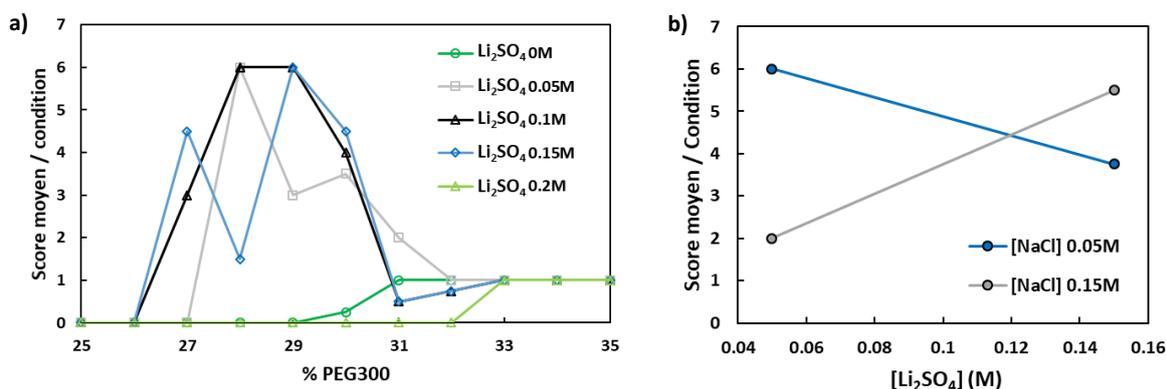


Fig.3.2.7 : Analyse de l'influence des variations de concentrations en Li_2SO_4 , pourcentage de PEG et concentration en NaCl sur le score des conditions testées avec les plaques de criblages (Fig.3.2.4). (a) Evolution du score moyen des gouttes en fonctions du pourcentage de PEG pour différentes concentrations en Li_2SO_4 . (b) Evolution du score moyen des gouttes en fonctions de la concentration en Li_2SO_4 pour différentes concentrations en NaCl, seules les conditions réalisées avec NaCl 0.05M/ Li_2SO_4 0.15M ou NaCl 0.15M/ Li_2SO_4 0.05M sont représentées dans ce graphique.

Tous les puits ont ainsi été notés suivant une échelle de scores compris entre 0 correspondant à l'obtention d'une goutte claire et 6 indiquant la présence de monocristaux de SpNox. Les courbes d'évolution du score en fonction du pourcentage de PEG300 et de la concentration de Li_2SO_4 (Fig.3.2.7.a) présentent des pics de score élevé semblant démontrer l'existence d'un pourcentage de précipitant optimal autour de 28%-30%. De plus, seules les concentrations de Li_2SO_4 comprises entre 0.05 et 0.15M ont permis d'atteindre un score de 6 attribué à la présence de monocristaux tandis que les conditions de Li_2SO_4 les plus extrêmes sur la gamme considérée (0M et 0.2M) ont conduit à des gouttes claires ou à la dénaturation de la protéine à partir d'un certain pourcentage de PEG.

L'évolution du score moyen des gouttes en fonction des concentrations en NaCl et Li_2SO_4 , démontre que lorsque la concentration de NaCl est faible (0.05M), le score diminue avec l'augmentation de la

concentration en Li_2SO_4 tandis que lorsque les concentrations en NaCl sont supérieures (0.15M), les meilleurs scores sont obtenus pour les plus hautes concentrations de Li_2SO_4 (Fig.3.2.7.b), suggérant ainsi l'existence d'un effet d'interactions croisées entre les concentrations de NaCl et de Li_2SO_4 impactant la cristallisation de SpNox .

Le nombre important de variables ($[\text{NaCl}]$, $[\text{Li}_2\text{SO}_4]$, $[\text{SpNox}]$, %PEG), la quantité élevée de conditions testées et la présence d'interactions croisées complexifient l'analyse détaillée de l'effet indépendant de chaque paramètre sur la cristallisation. Ainsi une analyse linéaire généralisée du résultat des gouttes et de la taille des cristaux en fonction des variables de la plaque de criblage (Tab.3.2.3) a donc été réalisée à l'aide du logiciel d'élaboration de plans d'expérience JMP® permettant de décorrélérer l'influence de chacun des paramètres sur la cristallisation de SpNox et d'établir un modèle visant à prédire la probabilité du score d'une condition en prenant en compte l'influence linéaire chaque variable indépendante ainsi les interactions croisées des paramètres pouvant influencer la cristallisation. Afin de simplifier l'étude, le résultat des gouttes est limité à trois catégories discrètes : Goutte claire, Cristaux et Précipité.

Puits	[SpNox] (mg/ml)	MES (M)	PEG (%)	NaCl (M)	Li_2SO_4 (M)	Score	Goutte
A10	9	0.1	28	0.05	0.05	0	Claire
A11	13	0.1	28	0.05	0.05	6	Cristaux
A12	19	0.1	28	0.05	0.05	6	Cristaux
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
F12	13	0.1	35	0.05	0.15	1	Précipité

Tab.3.2.3 : Exemple de mise en forme des données pour l'analyse statistique réalisée sous JMP®

Un premier modèle a été généré à l'aide du logiciel en ne considérant qu'un effet linéaire simple de chaque paramètre sur la cristallisation. La qualité du modèle obtenu peut être évaluée graphiquement en confrontant la prédiction de ce dernier aux résultats réels des gouttes, où chaque point correspond à une condition particulière de cristallisation (Fig.3.2.8.a).

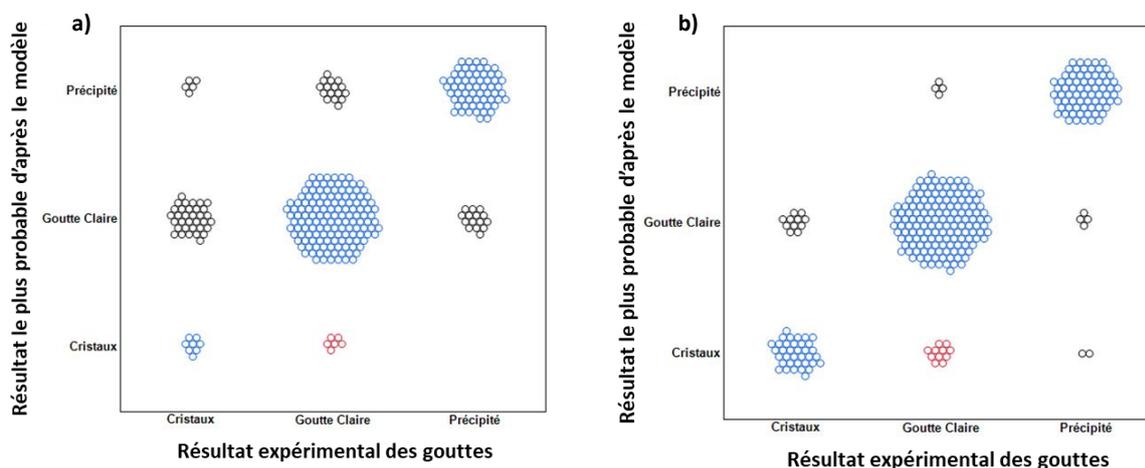


Fig.3.2.8 : Confrontation des résultats de gouttes prédits par le modèle avec les résultats expérimentaux des gouttes pour chacune des conditions de cristallisation testées. (a) Évaluation de la qualité de prédiction du modèle ne prenant en compte que des dépendances linéaires de chacun des paramètres influençant la cristallisation. (b) Évaluation de la qualité de prédiction du modèle prenant en compte les effets d'interactions croisées et des dépendances quadratiques. Chaque point représente une condition de cristallisation expérimentalement testée. Prédiction du modèle en accord avec le résultat réel (bleu), prédiction de cristallisation alors que la goutte réalisée expérimentalement ne présente pas de cristaux – Faux Positif (rouge), prédiction fautive différente des faux positifs (noir).

Une prédiction résultant de l'accord entre le modèle et la réalité est représenté en bleu, tandis que les prédictions de cristallisation incorrectes sont représentées respectivement en rouge pour les faux positifs (prédiction de cristal alors qu'aucun cristal n'a été obtenu en réalité) ou en noir pour refléter l'ensemble des conditions ou le résultat prédit n'est pas en accord avec la réalité (faux négatifs et autres erreurs de prédiction).

Ce diagramme révèle ainsi qu'un modèle simple n'incluant que des dépendances linéaires présente un taux d'erreur total de 26%, avec un taux de prédiction correctes de cristaux de seulement 23% et un taux de faux positif de 42.5%.

Afin d'améliorer le modèle de prédiction, l'ensemble des effets d'interactions croisées entre les différents paramètres et des interactions d'ordre 2 permettant d'attribuer une influence quadratique et non plus linéaire à certains paramètres, ont été pris en compte. La confrontation des prédictions de ce nouveau modèle avec les résultats expérimentaux révèle un taux d'erreur total de seulement 11% et un taux de prédiction correct de cristaux 76% (Fig.3.2.8.b).

Ce modèle fournit l'évolution des probabilités d'obtenir des cristaux, une goutte claire ou un précipité en fonction des valeurs de chaque variable influant sur la cristallisation. Il est alors possible de connaître la combinaison de valeurs de concentration en protéines, PEG, NaCl et Li_2SO_4 conduisant à la plus haute probabilité d'obtenir des cristaux. Ainsi d'après l'analyse des plaques de criblage réalisées sur SpNox, une condition de cristallisation rassemblant une concentration en protéine de 14mg/ml, un pourcentage de PEG300 de 28,2% et des concentrations en NaCl et Li_2SO_4 de respectivement 0.09M et 0.13M présenterait une probabilité de 98% de chance de cristallisation.

Ce modèle permet ainsi d'évaluer, à partir d'un grand nombre de données, l'influence de chaque facteur pouvant impacter la cristallogénèse afin de prédire les conditions favorables à la cristallisation. Cependant, les limites de ce modèle, caractérisées par exemple par un taux de faux positifs de 20% pouvant provenir de données insuffisantes pour l'étude statistique ou par l'évaluation des résultats restreintes à seulement trois classes (les microcristaux n'étant ainsi pas considérés équivalents aux cristaux de taille supérieure), ne permettent pas de se dispenser de la réalisation de l'expérience manuelle et la condition extraite ne constitue en aucun cas une solution unique et définitive pour la cristallisation de SpNox.

Ainsi à partir des cribles HTX à haut débit dont l'analyse manuelle aurait été impossible, ce modèle permet d'extraire les paramètres associés à une condition initiale à partir de laquelle est réalisé un affinement manuel. Cependant les expériences haut débit étant réalisées selon une configuration micro-goutte, un ajustement supplémentaire devra être réalisé lors de la cristallisation manuelle en ajustant une gamme autour de la condition prédite.

E. Caractérisation de la thermostabilité de SpNox en condition de cristallisation

Des conditions proches de celles extraites lors de cette analyse ont été testées afin d'évaluer la stabilité de SpNox à pH6, avec 0.1M NaCl et 0.15M Li_2SO_4 (Fig.3.2.9). La courbe de dénaturation obtenue en présence d'une solution optimum de cristallisation montre ainsi une augmentation du T_m de SpNox de 5°C par rapport à celui mesuré dans le tampon de conservation de la protéine. En accord avec l'établissement de contacts cristallins, les conditions de cristallisation identifiées par criblage semblent donc être stabilisantes pour SpNox par rapport aux conditions optimales de conservation.

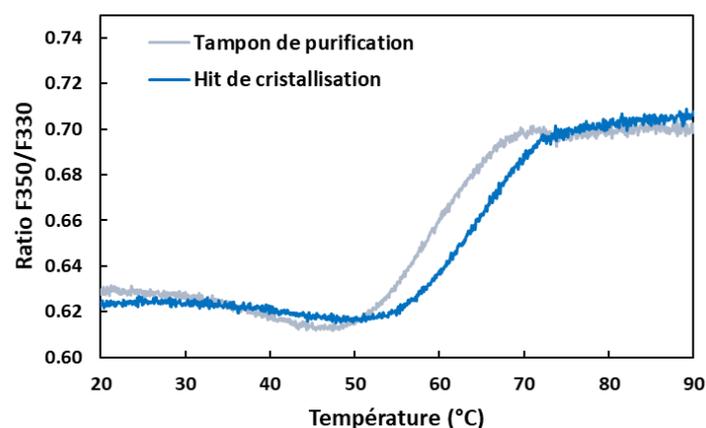


Fig.3.2.9 : Comparaison de la thermostabilité de SpNox dans les conditions de hits de cristallisation extraites des tests de criblage menés sur la plateforme HTX et dans les conditions de conservation classiques de la protéine. Courbe de dénaturation mesurée au nanoDSF sur SpNox à 1mg/ml au sein du tampon de gel filtration (courbe grise) ou au sein d'un tampon reproduisant, à l'exception du PEG une condition de cristallisation prédite comme favorable par le modèle établi (MES pH6, 0.1M NaCl et 0.15% Li₂SO₄).

2. Optimisation par test de cristallisation manuelle

Afin de mieux contrôler les paramètres physicochimiques influant sur la cristallisation de la protéine, des tests de cristallisation manuels par diffusion de vapeur ont été réalisés à partir des conditions identifiées sur la plateforme automatique.

A. Affinement manuel (Scale Up)

Un affinement des paramètres extraits à partir de la plateforme automatique a ensuite été réalisé sur des plaques de cristallisation manuelles en testant quatre variations de concentration de NaCl et Li₂SO₄ et six pourcentages de PEG300 (Tab.3.2.4).

[NaCl]	[Li ₂ SO ₄]	PEG (%)
0.1M	0.1M	28%-34%
0.15M	0.1M	28%-34%
0.1M	0.15M	28%-34%
0.15M	0M	28%-34%

Tab.3.2.4 : Conditions de cristallisation testées à pH6 sur des plaques 4x6 puits en diffusion de vapeur manuelle

De plus, afin d'améliorer la limite de résolution des cristaux de SpNox et d'assurer une meilleure reproductibilité de ceux-ci, des tests ont été réalisés en clivant l'étiquette polyhistidine présente à l'extrémité N-ter de la protéine. En effet, différents travaux ont suggéré que la présence d'une telle séquence en acide aminé pouvait introduire de la flexibilité au sein de la protéine [11] et pouvait ainsi impacter la stabilité et l'activité des protéines [12], réduire la qualité des contacts cristallins [13] ou même empêcher la cristallisation [14]. Cependant, en raison de l'existence d'autres études montrant que l'étiquette n'impactait que très légèrement les structures protéiques [15] et pouvait dans certains cas promouvoir la cristallisation [16], l'impact réel de cette séquence additionnelle semble ainsi difficile à évaluer et principalement dépendre de la protéine à cristalliser.

L'efficacité du clivage a été vérifiée en visualisant la différence de migration sur gel d'acrylamide de SpNox, respectivement sous forme clivée ou non (Fig.3.2.10). L'absence de bande retardée avec une bande unique dont la migration plus importante confirme le clivage de l'étiquette polyhistidine d'environ 1kDa et démontre que le clivage n'introduit pas une inhomogénéité, qui pourrait impacter la cristallogénèse, au sein de l'échantillon.

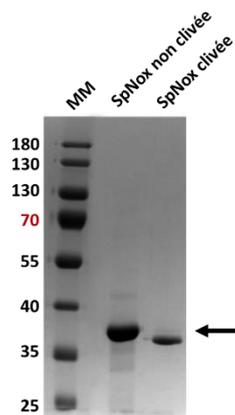


Fig.3.2.10 : Western Blot réalisé sur la protéine SpNox WT purifiée avant et après clivage de l'étiquette polyhistidine. La flèche indique la position de SpNox WT lié à l'étiquette polyhistidine.

Les premiers tests réalisés manuellement en absence d'étiquette polyhistidine au sein de la séquence protéique se sont révélés favorables et ont conduit à l'obtention de nombreux cristaux rouges hexagonaux de tailles variables relativement bien définis (Fig.3.2.11).

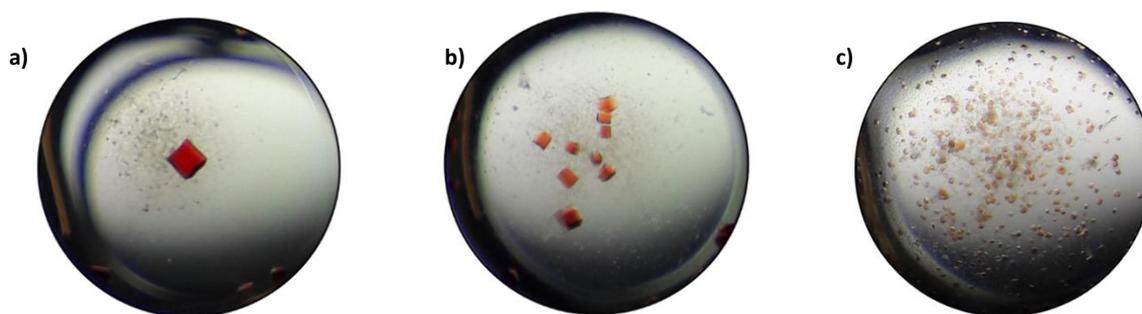


Fig.3.2.11 : Observations à J+5 de cristaux obtenus sur les plaques de criblages manuelles en faisant varier les concentrations en PEG et en sels. Cristaux obtenus avec SpNox 8mg/ml en MES pH6, NaCl 0.1M, Li₂SO₄ 0.15M avec 31% (a), 32% (b) et 33% (c).

B. Analyse de l'influence du PEG et des conditions de sels sur la cristallisation de SpNox

Afin d'évaluer l'influence des concentrations de PEG et de sels sur les cristaux de SpNox, une étude de la taille et du nombre de cristaux obtenus a été réalisée. Pour cela, j'ai décidé de développer un outil d'analyse permettant d'extraire automatiquement ces valeurs pour chaque condition testée à partir d'un cliché de la goutte à un temps défini après la réalisation de la plaque.

L'algorithme, développé pour fonctionner avec le logiciel libre ImageJ®, réalise la soustraction d'une version floutée du cliché à la photo originale afin d'éliminer le bruit de fond, les précipités, les bulles et les poussières puis le résultat de la soustraction est converti en masque négatif sur lequel est appliqué l'outil d'analyse des particules du logiciel de traitement d'image (Fig.3.2.12).

Le résultat de cette procédure est un fichier texte listant l'ensemble des cristaux identifiés dans la goutte et leur surface convertie en taille en calculant le diamètre d'un disque de même aire que le cristal. Le matériel d'observation des cristaux disponible ne permettant pas d'ajouter une échelle sur les photos, une procédure rigoureuse a été suivie lors la prise de cliché, réalisée sous loupe binoculaire à grossissement constant afin que toutes les gouttes présentent une taille similaire et la dimension des cristaux exprimée en unité arbitraire correspond ainsi une taille relative par rapport à la taille moyenne des gouttes.

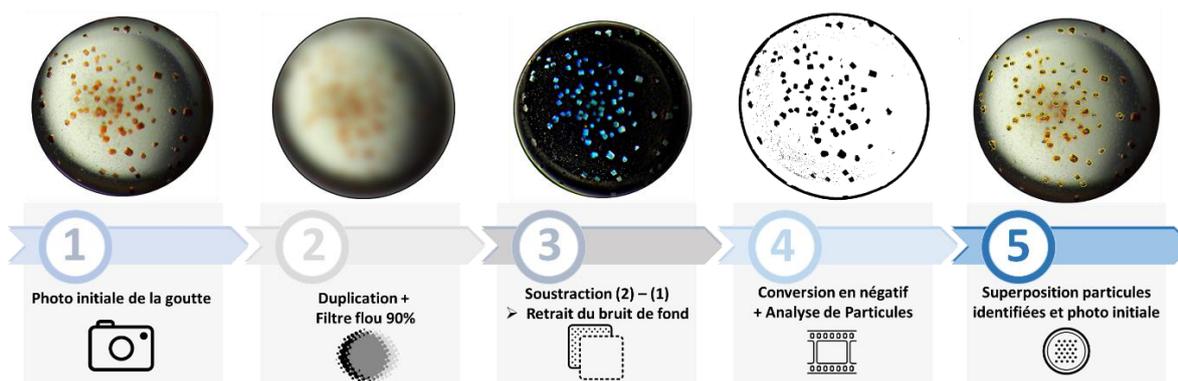


Fig.3.2.12 : Diagramme des étapes de l'algorithme développé sur ImageJ en Python pour l'analyse du nombre et de la taille des cristaux. La photo initiale de la goutte (1) est dupliquée et un filtre flou 90% est appliqué (2). La soustraction des deux clichés permet de retirer la majorité du bruit de fond (3). Un masque négatif est appliqué puis une analyse de particule est appliquée pour repérer et indexer les cristaux. Le contour des particules identifiées est superposé au cliché initial pour contrôler la capacité de l'algorithme à détecter tous les cristaux sans inclure de fausses particules dans l'analyse.

Cet algorithme a été appliqué sur l'ensemble des cristaux obtenus sur les plaques manuelles et on peut observer que cette méthode, particulièrement adaptée pour les gros cristaux (Fig.3.2.13.a), permet de repérer et caractériser la majorité des éléments. En revanche, dans les cas les plus critiques où une large zone d'ombre est présente, certains éléments ne sont pas détectés par l'algorithme notamment les cristaux situés sur les bords extérieurs de la goutte ou dans un plan focal différent de la photo (Fig.3.2.13.b et c). De plus lorsque les cristaux sont proches les uns des autres, ces derniers peuvent être considérés comme une particule de plus grosse taille, ainsi l'outil développé pourrait être amélioré afin de considérer ces cas particuliers.

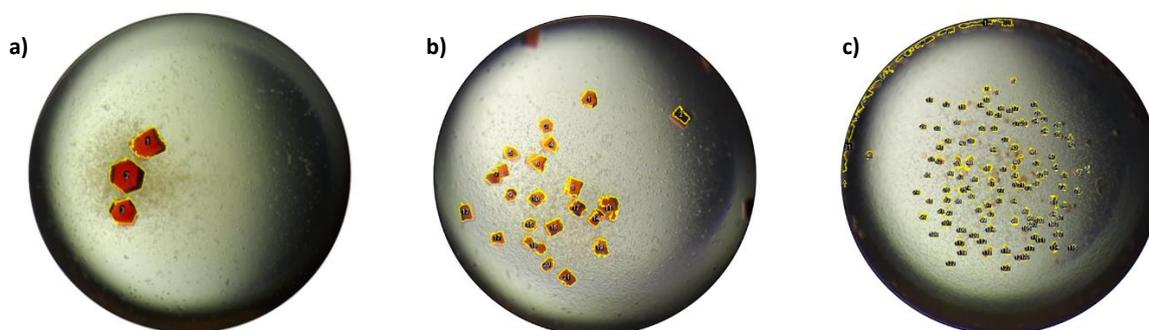


Fig.3.2.13 : Résultat de l'analyse ImageJ® appliqué sur des conditions présentant des cristaux de différentes tailles. (a) Le contour jaune représente les cristaux détectés et indexés superposés au cliché initial. La méthode est parfaitement adaptée aux gros cristaux. (b, c) Dans des conditions plus critique de cliché (ombre, cristaux plus petits), certains cristaux situés en bord de goutte ou dans un plan focal différent du cliché ne sont pas détectés.

Les résultats de cette analyse, tracés en fonctions des concentrations en sel et en PEG (Fig.3.2.14), montrent que le nombre de cristaux augmente significativement avec le pourcentage de précipitant tandis que la taille des cristaux décroît quel que soit les conditions en sels. En accord avec le diagramme de phase de cristallisation des protéines, les fortes concentrations de PEG déplacent l'équilibre de la goutte vers une région hautement sursaturée favorisant ainsi la formation de germes cristallins au détriment de la croissance de ceux-ci, aboutissant alors à un nombre important de petits cristaux (Fig.3.2.14.a). A l'inverse les faibles concentrations de PEG conservent l'équilibre de la goutte proche de la zone métastable privilégiant la croissance cristalline aux dépens de la formation de nouveau cristaux.

De plus les courbes représentées pour les différentes concentrations en sels montrent que les conditions avec 0.1M NaCl et 0.1M Li₂SO₄ conduisent systématiquement à des cristaux plus petits et

plus nombreux que les cristaux obtenus avec les conditions à 0.15M Li_2SO_4 indépendamment de la concentration en NaCl (Fig.3.2.14.b). Ces observations semblent ainsi témoigner d'un impact plus important de la concentration du lithium sulfate que de la concentration de NaCl sur le diagramme de cristallisation de SpNox.

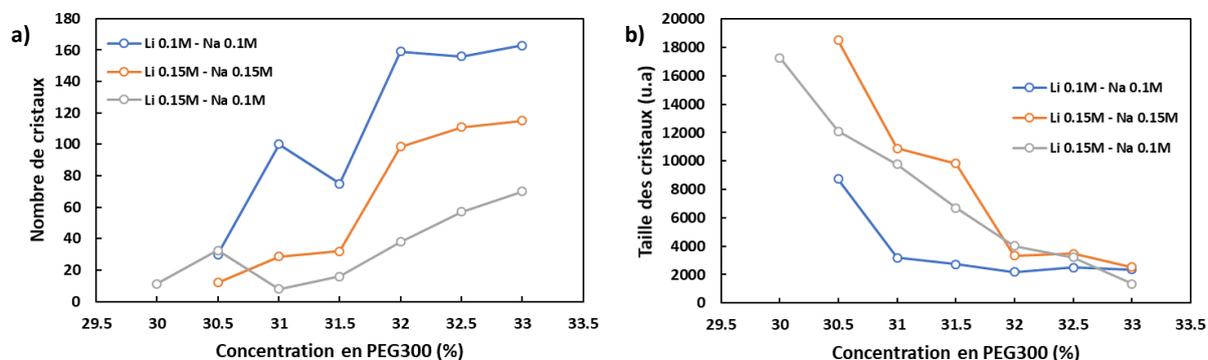


Fig.3.2.14 : Analyse du nombre et de la taille des cristaux en fonctions de la concentration en PEG300. Le nombre (a) et la taille (b) des cristaux obtenus avec 8mg/ml de protéine en MES pH6, ont été extraits à partir de l'algorithme développé pour ImageJ® pour trois conditions en NaCl/Li₂SO₄ : Na0.1M-Li0.1M (bleu), Na0.1M-Li0.15M (gris), Na0.15M-Li0.15M (rouge). A titre d'indication, la taille maximale des cristaux obtenues est de 500µm.

L'amélioration de la qualité du packing cristallin et donc de la diffraction des cristaux nécessitant de favoriser la croissance cristalline au détriment de la nucléation [17], les conditions avec 0.15M de Li₂SO₄ ont été privilégiées pour la suite des essais de cristallisation de SpNox.

C. Influence de l'étiquette His-Tag et du FAD (10µM) sur la cristallisation de SpNox

Des tests de cristallisation manuelle en diffusion de vapeur ont été également effectués dans le but de caractériser l'effet du clivage de l'étiquette polyhistidine (His-tag) et de l'ajout du FAD sur la cristallogénèse de SpNox. Les conditions de cristallisation réalisées avec SpNox non clivée n'ont conduit à aucune nucléation sur la gamme de précipitant testée, tandis que 66% des conditions réalisées avec la protéine issue de la même purification mais dont l'étiquette polyhistidine a été clivée ont conduit à des cristaux (Fig.3.2.15.a). Cela semble ainsi confirmer la nécessité de clivage de l'étiquette polyhistidine après purification afin de favoriser l'apparition de cristaux.

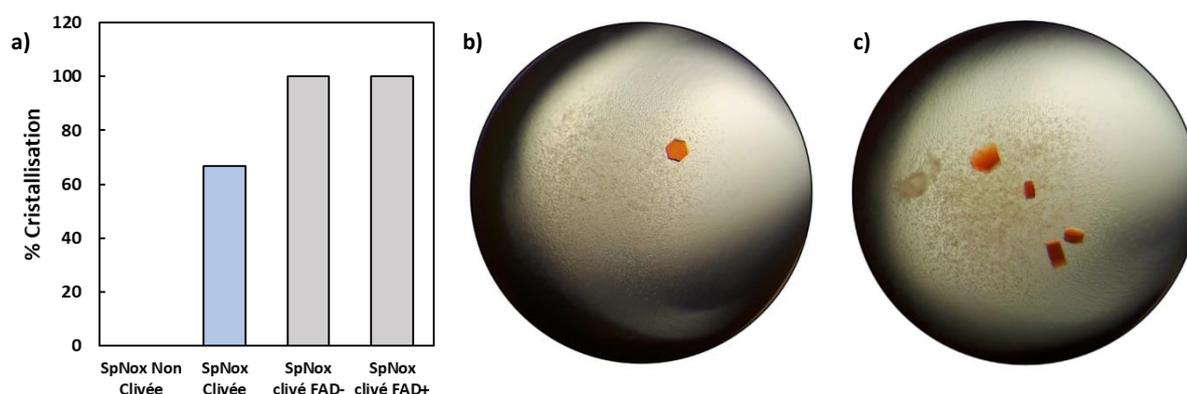


Fig3.2.15 : Analyse de l'effet du clivage de l'étiquette polyhistidine et de l'ajout de FAD 10µM sur la cristallisation de SpNox. (a) Taux de cristallisation obtenue en présence ou absence de clivage de l'His-tag (FAD 10µM) ou avec et sans ajout de FAD 10µM (His-tag clivée). (b) Cristal obtenue avec 8mg/ml de SpNox avec clivage de l'his-tag, MES pH6, 31% PEG300 Li₂SO₄ 0.15M, 10µM FAD. (c) Cristal obtenu avec 8mg/ml de SpNox avec clivage de l'his-tag, MES pH6, 31% PEG300 Li₂SO₄ 0.15M.

Toutes les conditions testées afin d'évaluer l'effet de la présence de FAD dans le tampon de SpNox ont conduit à la croissance de cristaux d'allures relativement similaires, indépendamment de l'ajout du cofacteur FAD lors de la purification de la protéine, indiquant que la présence de FAD (10µM) ne

semble pas avoir d'impact sur la cristallisation de SpNox. En revanche la présence de FAD est nécessaire pour obtenir la structure de la protéine liée avec son cofacteur (Fig.3.2.15.b,c).

D. Diagramme de phase de SpNox à 20°C

Afin de mieux maîtriser la cristallogénèse de SpNox dans les conditions de sels extraites et d'affiner les conditions conduisant à l'apparition de cristaux de grande taille, le diagramme de phase de la protéine en présence d'une concentration de 0.15M Li_2SO_4 a été produit grâce à la réalisation de nouvelles plaques de cristallisation, en élargissant les gammes de PEG et de concentrations de protéine (Fig.3.2.16.a) [18]. Les résultats obtenus à J+8 au sein des gouttes permettent l'identification des conditions favorisant la croissance et la nucléation de SpNox en mettant en évidence l'interface démarquant la zone de solubilité, définie par des gouttes claires, des hits de cristallisation. Il est également possible d'identifier la zone de nucléation qui s'étend de 30% à 37% de précipitant, ainsi que la région métastable autorisant la croissance des cristaux les plus gros. Enfin, la zone de précipitation peut être identifiée en présence de 13 mg/mL de SpNox et 37% de PEG.

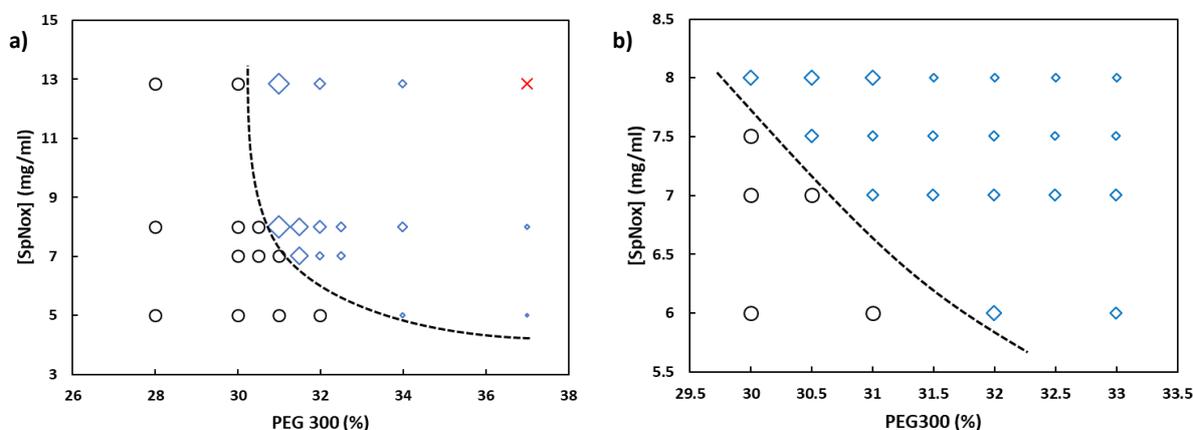


Fig.3.2.16 : Diagrammes de phase obtenus à J+8 à 20°C pour la protéine SpNox clivée de I His-Tag en MES pH6, Li_2SO_4 0.15M.
 (a) Diagramme de phase obtenu sur une gamme de PEG de 26 à 36% et une gamme de concentration de SpNox de 5 à 13mg/ml.
 (b) Affinement du diagramme de phase sur une gamme de PEG de 29.5 à 33.5% et une gamme de concentration de SpNox de 6 à 8mg/ml. (o) gouttes claires à J+8, (◇) obtention de cristaux dont la taille est représentée par la taille des losanges, (x) précipité

Ce diagramme de phase obtenu à 20°C (Fig.3.2.16.a) met en évidence les conditions optimales à la croissance de monocristaux de grandes tailles ainsi que l'allure très abrupte de la limite de solubilité pour une faible variation de la concentration en protéine, entre 8 et 13mg/ml et entre 5 et 7mg/ml, qui souligne un effet primordial de ce paramètre ainsi que de la concentration en PEG sur la cristallisation de SpNox. Ainsi en présence de concentrations élevées de protéine, une modification mineure du pourcentage de précipitant peut induire un déplacement de l'équilibre vers la zone de solubilité, tandis qu'à plus basse concentration de SpNox, l'effet d'une légère variation de la concentration protéique peut conduire à un déplacement similaire dans le diagramme de phase. L'existence d'une telle influence au sein de la solution de cristallisation, conditionnant directement l'apparition ou non de cristaux, indique l'importance de la réalisation d'un tel diagramme de phase autour d'une condition à optimiser, permettant ainsi de choisir des paramètres adaptés afin d'augmenter la taille et le nombre de cristaux.

Une analyse plus détaillée autour de la limite de solubilité a pu être obtenue grâce à de nouvelles conditions recentrées sur une gamme de concentration en protéine plus fines entre 6 et 8 mg/ml et des pourcentages de PEG restreints entre 30 et 33% (Fig.3.2.16.b), et démontre que de faibles variations de concentration de protéine et de pourcentage de précipitant impactent de manière

significative la taille des cristaux. Ainsi pour une concentration croissante de 6 à 8mg/ml, le pourcentage minimum de PEG permettant d'obtenir des cristaux diminue de 32 à 30% et les cristaux obtenus à 8mg/ml et 32% de PEG présentent une taille largement réduite par rapport à la condition à 6mg/ml. En accord avec le diagramme de cristallisation de SpNox, une concentration de protéine de 8mg/ml en présence de 30-31% de PEG semble donc constituer la condition optimale permettant d'obtenir de gros cristaux selon une reproductibilité satisfaisante.

E. Diffraction des cristaux manuels de SpNox FL

Afin d'évaluer la reproductibilité de la cristallogenèse dans les conditions de PEG et de sels extraites précédemment, des essais ont été effectués sur des lots de protéine issus de trois purifications différentes et concentrés à 8mg/ml. Les tests ont conduit à la croissance dans 77% des puits de gros cristaux hexagonaux bien définis en accord avec les études précédentes (Fig.3.2.17). La caractérisation de ceux-ci sur la ligne ID30a-1 de l'ESRF présentent une moyenne de qualité de diffraction autour de 5.5Å avec la meilleure limite de résolution à 4.5 Å (Fig.3.2.18), démontrant ainsi une amélioration significative de 4.5Å par rapport aux meilleurs cristaux obtenus sur la plateforme HTX.

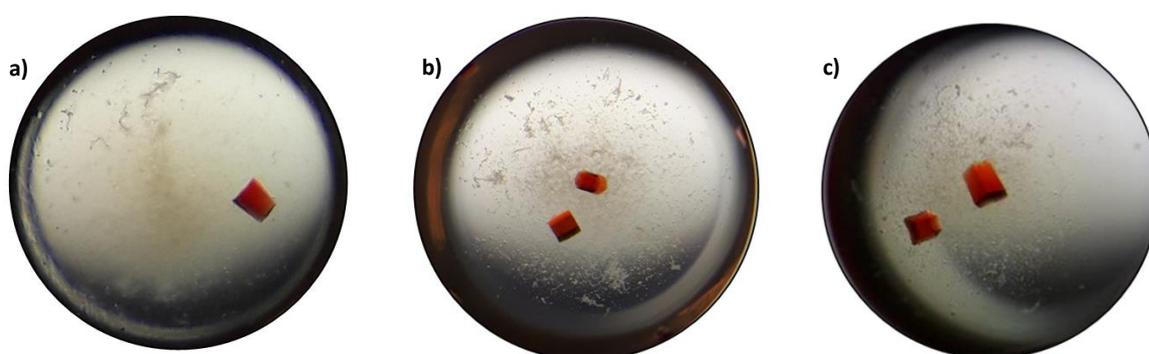


Fig.3.2.17 : Etude de la reproductibilité de la cristallisation de SpNox et de la diffraction des cristaux. La condition 8mg/ml, MES pH6, 30% PEG300, NaCl 0.1M, Li₂SO₄ 0.15M a été reproduit sur trois lot de protéine issus de purification différentes. Protéine du 30 Oct. (a), protéine du 12 Nov. (b), protéine du 04 Déc. (c).

Malgré l'amélioration significative de la qualité de diffraction des cristaux de SpNox, les données brutes de diffractions obtenues restent insuffisantes pour résoudre la structure de la protéine et l'exploration d'autres stratégies a été requise afin de poursuivre l'abaissement de la limite de résolution maximale atteinte grâce à la diffraction des cristaux de SpNox.

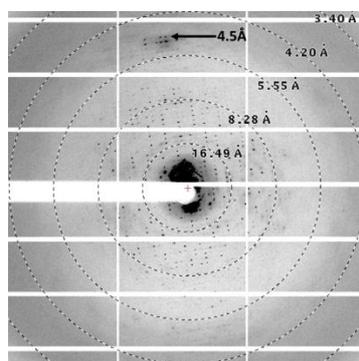


Fig.3.2.18 : Cliché de diffraction des cristaux de SpNox obtenus par diffusion de vapeur en condition manuelle. Les cristaux obtenus 8mg/ml, MES pH6, 30% PEG300, NaCl 0.1M, Li₂SO₄ 0.15M présentent une limite de diffraction optimale de 4.5Å.

Afin de vérifier l'absence de dégradation protéique au sein de la forme cristallisée, qui pourrait expliquer une diffraction maximale limitée, l'intégrité de SpNox au sein de cristaux obtenus manuellement par diffusion de vapeur a été caractérisée par gel SDS-page révélé à l'argent. La

comparaison des différents échantillons révèle que les profils obtenus pour la protéine soluble purifiée au sein des cristaux sont similaires et présentent deux bandes à 38kDa et environ 70kDa qui pourraient éventuellement correspondre à l'association de monomère sous forme dimériques, éventuellement à travers la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre chacune des cystéines présentes dans le domaine DH des monomère de SpNox, et n'indiquent pas la présence de dégradation au sein de l'échantillon pouvant expliquer les niveaux de diffraction observés.

3. Stratégies d'amélioration de la qualité de diffraction des cristaux

La pouvoir de diffraction des cristaux dépend directement de la qualité de l'ordre interne dans l'empilement cristallin. Au sein des cristaux de macromolécules, la présence de canaux et de cavités accessibles au solvant, créant des espaces relativement grands entre les molécules adjacentes et affaiblissant ainsi la force des contacts cristallin contribue souvent à limiter la résolution maximale atteinte par le cliché de diffraction. En effet, dans ces conditions, certaines protéines peuvent adopter des orientations ou des positions qui ne sont pas toutes exactement équivalentes au sein de la maille et être à l'origine de l'apparition de défauts d'empilements impactant directement la résolution.

Plusieurs approches ont été développées pour améliorer les contacts cristallins et l'analyse du pourcentage de solvant au sein des cristaux de macromolécules, déterminé par le coefficient de Matthews, a démontré l'existence d'une corrélation importante entre une quantité de solvant réduite et l'amélioration de l'empilement cristallin et par conséquent de la limite de résolution. [19, 20].

A. Variations des Sels – Echelle de Hofmeister

La solubilité de la protéine, qui présente une forte dépendance à la force ionique de la solution ainsi qu'à la concentration des ions en présence, peut ainsi être ajustée afin de retirer l'excédent de solvant au sein des cristaux et renforcer les contacts cristallins.

A faible force ionique, l'augmentation de la concentration en sels conduit, à travers l'établissement d'interactions électrostatiques participant à l'écrantage de contacts entre le solvant et la protéine et limitant ainsi l'accès au solvant, à une solubilité accrue de la protéine (salting in). Cependant, au-delà d'un certain seuil, l'ajout de sel en concentration croissantes provoque une diminution de solubilité en raison d'interaction hydrophobes (salting out).

L'échelle de Hofmeister permet ainsi de classer les différents ions en fonction de leur capacité à solubiliser la protéine (salting in/salting out) et permet de distinguer ions kosmotropes et chaotropes favorisant la solubilité à respectivement faible et haute concentration.

Les ions Na^+ et Li^{2+} , dont la présence a été préalablement identifiée comme favorisant la cristallisation de SpNox, constituent des espèces cationiques proches selon le classement établi par Hofmeister, révélant ainsi que ceux-ci pourraient exercer des effets de solubilisation relativement similaires et adaptés pour la cristallisation de la protéine.

Afin de tenter d'améliorer l'arrangement cristallin, l'utilisation de l'ion K^+ , également proche selon la série de Hofmeister des ions Na^+ et Li^{2+} , mais dont les propriétés légèrement plus kosmotropes, permettraient théoriquement de réduire la concentration de sels de la solution de cristallisation tout en conservant un effet de solubilisation similaire (Fig.3.2.19), a ainsi été identifié pour la réalisation de deux nouvelles plaques de criblage. Les différentes combinaisons de variations des proportions des deux sels en présence utilisées pour ces cribles sont similaires à celle présentées dans le tableau Tab.3.2.4, en substituant le NaCl et le Li_2SO_4 respectivement par le KCl et le K_2SO_4 . L'analyse des hits obtenus semble indiquer que les résultats les plus prometteurs sont obtenus avec ces combinaisons

de sels pour un mélange constitué à partir de 0.15M KCl et 0.15M Li₂SO₄ conduisant à la formation de cristaux de SpNox rouges et hexagonaux mais de taille relativement faible par rapport aux cristaux obtenus précédemment. Cependant, ces hits n'ont pas pu être caractérisés aux rayons X et aucune donnée concernant l'effet du KCl sur la qualité de diffraction n'a donc pu être extraite et les essais n'ont donc pas été poursuivis en raison de la taille inférieure des cristaux obtenus.

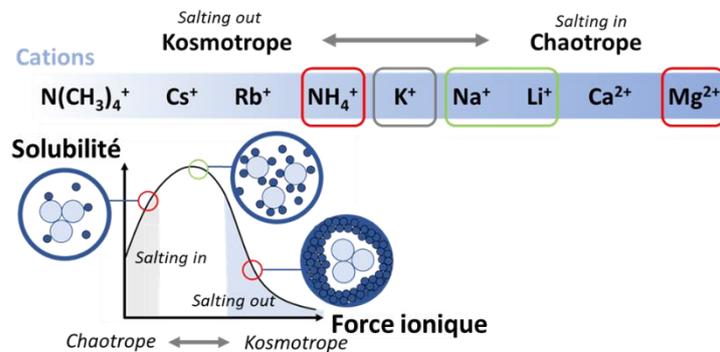


Fig.3.2.19 : Série de Hofmeister pour les cations. Les cations chaotropes augmentant la solubilité de la protéine pour des concentrations croissantes de sels sont situés sur la gauche du diagramme tandis que les cations kosmotropes augmentant la solubilité pour les faibles concentrations de sels sont situés sur la droite. Les cations encadrés en rouge ont été testés lors du projet de thèse précédent, les cations encadrés en vert ont été mis en évidence au cours de cette étude comme favorisant la cristallisation de SpNox. Le cation encadré en gris est testé sur de nouvelles plaques de criblages

B. Criblage d'Additifs

Afin de renforcer les contacts au sein des cristaux de protéine, une approche alternative aux optimisations de pH, de précipitant et de sels, consistant à l'identification de petites molécules biologiquement actives regroupées sous le nom d'additifs pouvant favoriser la croissance ordonnée des cristaux a été développée [21, 22]. L'incorporation d'additifs dans l'empilement de protéines semble conduire à la formation de nouvelles interactions moléculaires dans un réseau cristallin à travers l'établissement de liaisons hydrogènes, électrostatiques, et éventuellement hydrophobes et ainsi favoriser l'association ordonnée de protéine

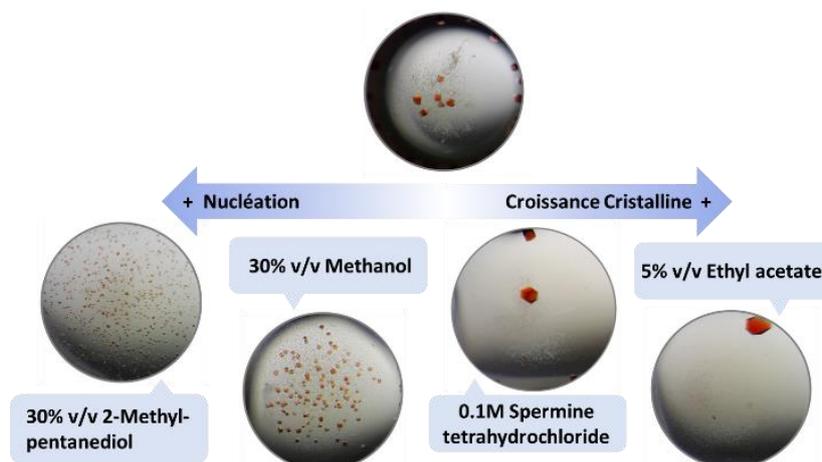


Fig.3.2.20 : Exemple d'additifs permettant la cristallisation de SpNox en privilégiant le phénomène de nucléation (gauche) ou la croissance de cristaux de SpNox en comparaison de la condition sans additif. La condition initiale a été obtenue à 31% PEG300 avec 0.1M NaCl et 0.15M Li₂SO₄, les tests d'additifs ont été réalisés dans les mêmes conditions avec le même lot de protéine. 0.2ml d'additifs sont ajoutés au mélange de 1µl de protéine/1µl de solution de puits.

Afin d'améliorer les contacts potentiellement faibles au sein cristaux de SpNox et responsables d'une diffraction limitée, un criblage de 96 additifs (HR2-428, Hampton research) réparti selon différentes catégories telles que les cations multivalents, les composés organiques ou encore les polymères, a été réalisé lors d'études de cristallisation de SpNox WT par diffusion en phase vapeur manuelles et 47%

des molécules actives testées ont conduit à la cristallisation de SpNox. La comparaison avec la goutte contrôle ayant aboutie à une dizaine de cristaux de tailles moyennes en absence d'additifs, a permis d'identifier des composants favorisant la nucléation ou à l'inverse la croissance cristalline (Fig.3.2.20).

Trois classes d'additifs (Cations multivalents, Organiques volatiles et non volatiles et Polyamines) ont démontré un taux de cristallisation relativement élevé par rapport aux nombres de conditions testés permettant notamment d'étudier l'influence des variations entre additifs au sein d'une même classe (Fig.3.2.21).

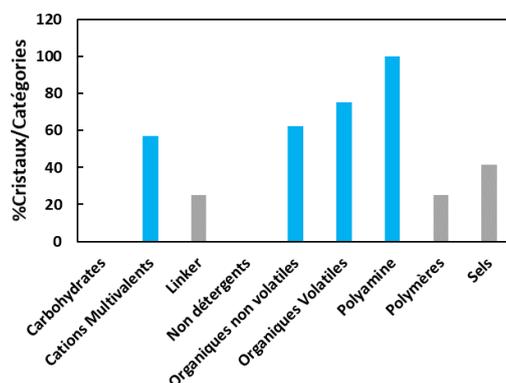


Fig.3.2.21 : Pourcentages de conditions conduisant à la cristallisation de SpNox par catégorie d'additif. Pour chaque classe d'additif, le nombre de molécules conduisant à des cristaux est normalisé par le nombre d'additifs total correspondant à la catégorie. Les séries sont représentées en bleu lorsque le pourcentage est supérieur à 50% et gris pour un pourcentage inférieur à 50%.

Ainsi l'observation des hits obtenus en présence de composés organiques volatiles semble mettre en évidence l'impact du taux d'hydratation des cation métalliques sur la cristallisation de SpNox (Fig.3.2.22). En effet aucun cristal n'a été obtenu pour les cations hexahydrates et l'ion tetrahydrate n'a permis la croissance que de quelques petits cristaux qu'en bord de goutte, où la sursaturation relative est la plus élevée. Au contraire les additifs dihydratés ont conduit à la croissance de plusieurs monocristaux d'aspect et de taille satisfaisants, en revanche l'utilisation des ions monohydratés conduit à un trop grand nombre de microcristaux pour la collecte de ceux-ci. Ainsi l'augmentation de l'hydratation des cations sur la gamme testée de 1 H₂O à 6 H₂O, semble déplacer l'équilibre de la goutte de cristallisation d'un état proche de l'interface nucléation/précipitation vers la zone de solubilité en accord avec l'incorporation supplémentaire de solvant. Cet effet peut ainsi être utilisé afin de moduler la cristallisation des protéines à l'inverse de l'effet observé lors de l'augmentation de la concentration en PEG. Ainsi l'additif de type cation dihydraté, bien qu'il n'ait pas changé la forme générale des cristaux, semble le plus adapté pour la cristallisation de SpNox.

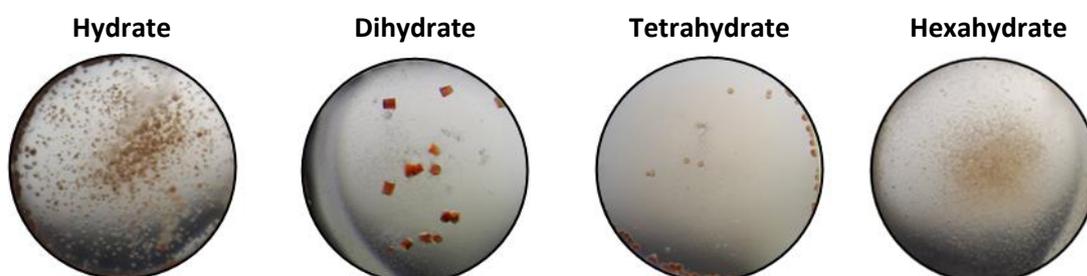


Fig.3.2.22 : Effet des additifs multivalents sur la cristallisation de SpNox en fonction du nombre de molécules de solvant liées au cation métallique. Les gouttes présentent des exemples représentatifs des conditions testées avec les ions multivalents. L'augmentation de l'hydratation de l'ion utilisé comme additif semble déplacer la goutte vers la zone de solubilité

Les composés organiques volatiles ont quant à eux révélés l'influence de la chaîne carbonée des alcools sur la cristallisation de la protéine avec des cristaux plus petits et plus nombreux lorsque la longueur de l'alcane augmente (Fig.3.2.23).

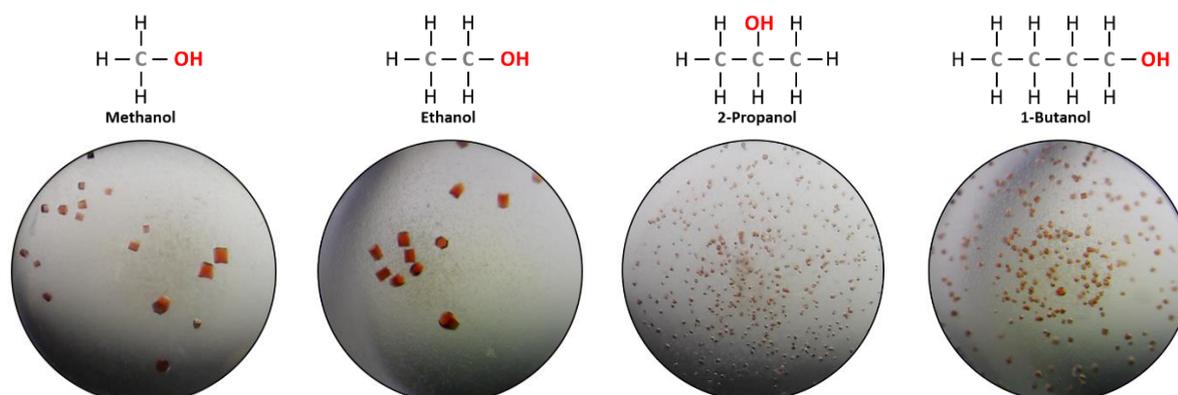


Fig.3.2.23 : Influence de la longueur de la chaîne carbonée des alcools testés comme additifs. L'augmentation de la longueur de chaîne de l'alcool volatil semble favoriser la nucléation avec l'obtention de cristaux plus petits et plus nombreux.

Cependant cette observation ne semble pas vérifiée pour tous les composés organiques notamment concernant les esters qui ont démontrés une croissance importante de SpNox indépendamment de la longueur des chaînes carbonées (Fig.3.2.24).

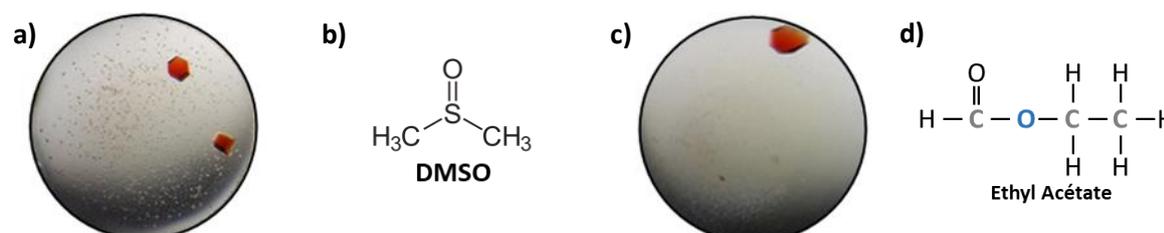


Fig.3.2.24 : Cristaux obtenus en présence de SpNox 8mg/ml MES pH6, 31% PEG300, 0.1M NaCl, 0.15M Li₂SO₄, 0.15M et ajout d'additif esther 0.1M suivant le mélange 1:1:0.2 : DMSO 30% (a), Éthyle Acétate (c). Les molécules des additifs sont respectivement représentées en (b) et (d).

Enfin les 4 polyamines testés ont conduit à des cristaux de SpNox très différents en taille et en quantité (Fig.3.2.25) et aucune dépendance n'a pu être observée en fonction des paramètres physico-chimiques des polyamines testées.

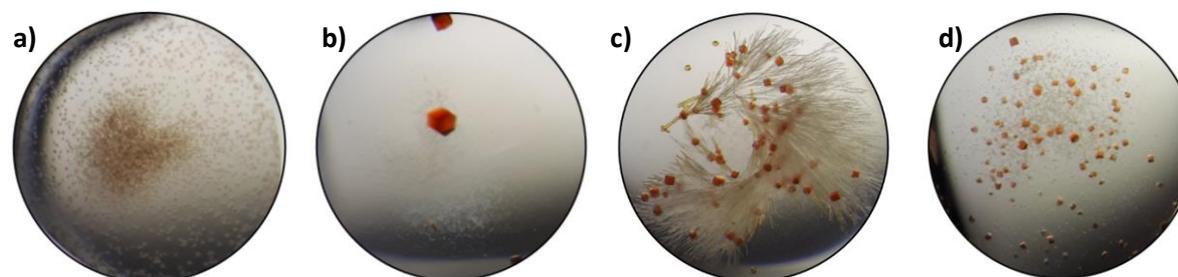


Fig.3.2.25 : Cristaux obtenus en présence de SpNox 8mg/ml MES pH6, 31% PEG300, 0.1M NaCl, 0.15M Li₂SO₄, 0.15M et ajout d'additif polyamine 0.1M suivant le mélange 1:1:0.2 : Spermidine (a), Spermine tetrahydrochloride (b), Hexamine cobalt(III) chloride (c), Sarcosine(d).

La caractérisation par diffraction des rayons X de l'ensemble de ces cristaux a été réalisée sur la ligne ID30a-1 de l'ESRF, en revanche aucune amélioration de la limite de résolution n'a été observée, avec une moyenne autour de 7.9Å.

En revanche, les additifs NaI, NaF et NaBr, correspondant tous les trois à la série des halogènes ont présentés des qualités de diffraction parmi les meilleures (Fig.3.2.26) mesurées pour les additifs avec des niveaux de diffractions respectives de 4.52Å, 5.75Å et 6.8Å. Ces observations montrent que SpNox cristallise relativement facilement en présence d'additifs de la famille des halogènes avec des niveaux de diffraction relativement proches des cristaux natifs.

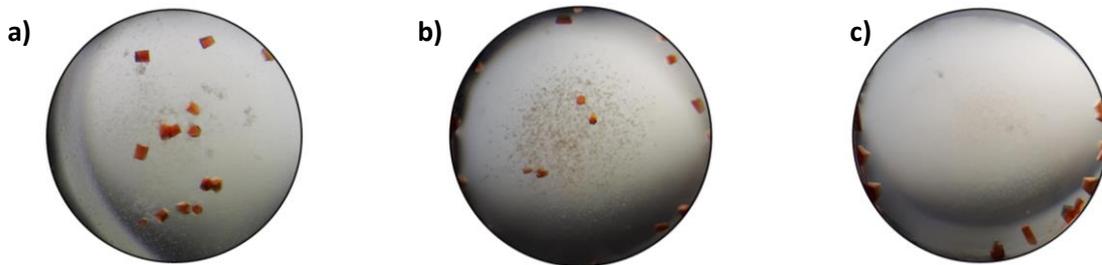


Fig.3.2.26 : Cristaux obtenus en présence de SpNox 8mg/ml MES pH6, 31% PEG300, 0.1M NaCl, 0.15M Li₂SO₄ 0.15M et ajout d'additif de la famille des halogènes suivant le mélange 1:1:0.2 : Sodium Iodide 1M (a), Sodium Fluoride 0.1M (b), Sodium fluoride 0.5M (c).

C. Amélioration de la qualité cristalline par ensemencement

a. Micro-seeding

Dans le but d'obtenir un meilleur contrôle de la croissance des cristaux afin d'améliorer la qualité des contacts cristallins et ainsi essayer d'augmenter la limite de résolution atteinte lors de la collecte des données, une stratégie d'ensemencement a été effectuée. Cette technique, utilisée pour améliorer la qualité de diffraction des cristaux de protéine, permet de décorrélérer les étapes de nucléation et de croissance cristalline afin de contrôler de manière optimale et indépendante ces deux étapes intrinsèques au processus de cristallisation [23].

Pour cela les cristaux initiaux obtenus dans des conditions hautement sursaturées (32,5% de PEG300) ont ensuite été collectés puis réduits en fragments cristallins à l'aide de billes céramiques. Après dilution à 0.1x et 0.01x, ceux-ci sont placés dans des conditions correspondant à des dilutions réalisées selon une gamme variant de 5% à 50% de la condition initiale afin d'atteindre un degré de sursaturation inférieur permettant de privilégier une croissance lente et ordonnée de cristaux directement à partir des germes, en absence de nucléation spontanée.

Seules les conditions avec une réduction de pourcentage de PEG300 de 5% soit 30.8% de PEG ont permis la croissance des graines cristallines en cristaux de petites tailles nécessitant ainsi plusieurs cycles successifs d'ensemencement pour l'optimisation des cristaux. Cependant ceux-ci peuvent également être fragmentés afin de conduire d'expériences supplémentaires où l'ensemencement est réalisé dans des conditions aléatoires afin d'explorer de nouvelles conditions de cristallisations.

Ce résultat semble néanmoins démontrer que malgré les données du diagramme de phase réalisé précédemment, 30.8% de PEG correspondent à une condition de sursaturation trop faible pour amener la goutte au milieu de la zone métastable et favoriser la croissance cristalline (Fig.3.2.27), pouvant indiquer que la dilution des autres composants du puits de cristallisation impacte le diagramme de phase initial.

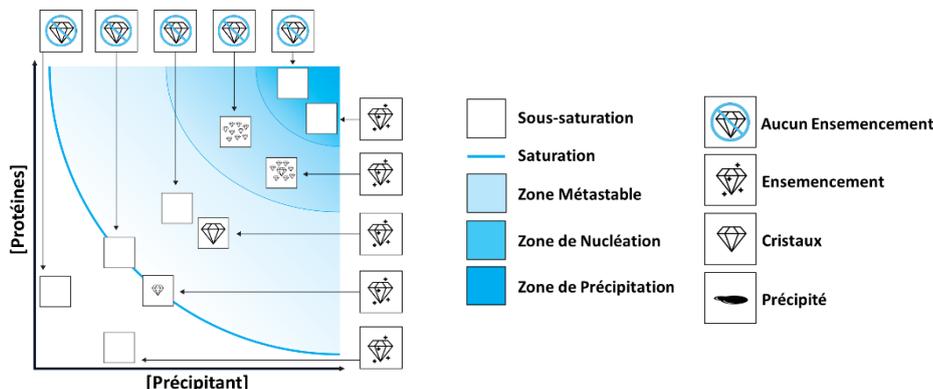


Fig.3.2.27 : Evolution des gouttes de cristallisation avec ou sans ensemencement en fonction de la condition de sursaturation de la goutte ensemencé. Les gouttes du dessus ne sont pas ensemencées et ne conduisent à aucun cristal pour les conditions de saturation correspondant à la zone métastable (bleu pâle). A l'inverse les cristaux ensemencés au milieu de la zone métastable conduisent à des gros cristaux, cependant au niveau de l'interface zone métastable/solubilité, les cristaux restent de petites tailles malgré l'ensemencement.

b. RMMS

Afin d'identifier de nouvelles conditions permettant la croissance optimale des germes cristallins obtenus par diffusion de vapeur manuelle, des criblages similaires tests initiaux ont été reproduits en présence de germes cristallins (Random microseed matrix screening, RMMS) permettant de s'affranchir de la barrière d'énergie de nucléation. Cet avantage énergétique pourrait conduire à la mise en évidence d'un plus grand nombre de conditions aboutissant à des cristaux.

L'analyse des taux de cristallisation obtenus en fonction du tampon confirme que le MES pH6, constitue le tampon le plus adapté pour la cristallisation de SpNox avec 60% des conditions conduisant à des cristaux (Fig.3.2.28.a). Cette étude met également en évidence que le tampon HEPES pH7, pour lequel 48% des conditions ensemencées ont permis la croissance cristalline, pourrait être une alternative au MES préalablement identifié dans les tests initiaux en absence de germes, et dont l'apport d'améliorations supplémentaires de la croissance des germes pourrait ainsi se révéler limité.

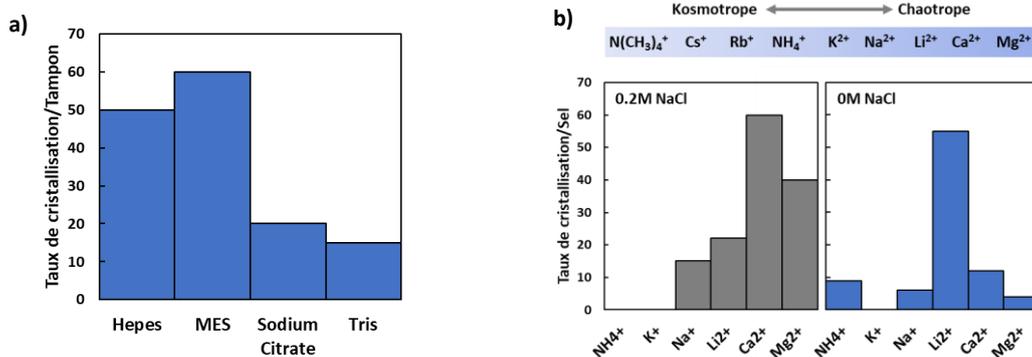


Fig.3.2.28 : Taux de cristallisation obtenu par tampon et par condition de sels. Les histogrammes représentent les pourcentages de conditions conduisant à des cristaux pour chaque condition de tampon ou de sels. (a) Taux de cristallisation par condition de tampon. (b) Taux de cristallisation par conditions de sels avec en présence de 0.2M NaCl (gris) ou sans NaCl initialement présent dans la solution de cristallisation.

Les études RMMS ont également mis en évidence une dépendance des conditions de cristallisation à la présence de NaCl (Fig.3.28.b). Ainsi en absence de NaCl, les résultats confirment que parmi les sels testés seul le Li₂SO₄ conduit à la cristallisation de SpNox en exerçant une influence majeure avec un taux de succès (50%) cinq fois supérieurs aux autres sels, en revanche en présence de NaCl 0.2M, une amélioration progressive du taux de cristallisation peut être observée avec un effet chaotrope croissants associés aux cations tels que les ions Ca²⁺ et Mg²⁺, présentant respectivement des taux de succès de 60% et 40% lorsqu'ils sont associés au NaCl.

Au sein des macromolécules, les groupement phosphoryles tels que ceux du FAD présentent souvent du $MgCl_2$ dans leur environnement [24], or SpNox liant un cofacteur FAD, le Mg^{2+} a été privilégié par rapport au Ca^{2+} afin d'évaluer ses potentiels avantages pour la cristallogénèse de SpNox en tant qu'additif ou composant du tampon de purification.

1. Thermostabilité en présence de $MgCl_2$

Les interactions ioniques pouvant jouer un rôle important dans la stabilité notamment des protéines liant les nucléotides, des mesures initiales de thermostabilité en présence de gammes de concentration en $MgCl_2$ ont été réalisées afin de définir la concentration optimale de cation chaotrope pour favoriser la stabilité de SpNox. Le tampon de purification initial contenant du chlorure de sodium 0.3M, ces mesures reproduisent la composition NaCl/ $MgCl_2$ identifiée par RMMS.

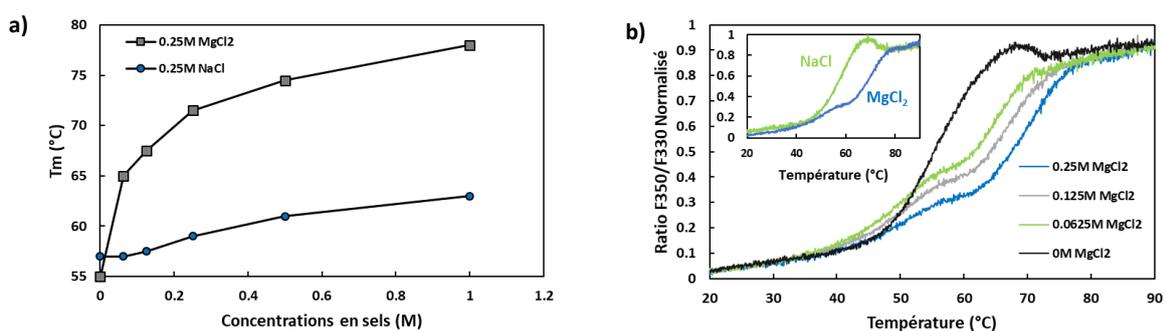


Fig.3.2.29 : Evolution de la thermostabilité de SpNox en présence d'une gamme de concentration de $MgCl_2$: (a) Evolution du T_m en présence de $MgCl_2$ (□) et de NaCl (•). (b) Profil de dénaturation de SpNox en présence d'une gamme de $MgCl_2$. La figure en insert représente la comparaison des profils de dénaturation obtenu en présence de NaCl ou $MgCl_2$.

La caractérisation de la stabilité de SpNox montre que le T_m de la protéine augmente significativement avec une concentration croissante en $MgCl_2$ indiquant un effet stabilisant de ce sel (Fig.3.29.a). De plus les profils de dénaturations (Fig.3.29.b), présentent une double transition caractérisée par un premier T_m de 51°C suivi d'un second T_m dont la température varie en fonction de la concentration en $MgCl_2$ indiquant que ce sel est probablement à l'origine de cette seconde transition.

Afin de vérifier que le $MgCl_2$ est responsable de la stabilisation du deuxième T_m les résultats ont été comparés avec la gamme NaCl réalisée dans le chapitre précédent. L'augmentation du T_m de SpNox en présence de NaCl est significativement plus faible que dans le cas du $MgCl_2$, et contrairement au cas du cation chaotrope, une unique transition est observée sur les profils de dénaturation mesurés avec le NaCl confirmant ainsi que la stabilisation du deuxième T_m est dû à l'effet du $MgCl_2$ sur les interactions ioniques.

Ainsi les sels semblent exercer une influence en contribuant à la stabilité de SpNox et un effet supplémentaire spécifique a été observé en présence de $MgCl_2$ suggérant un effet stabilisant supplémentaire avec cet additif. Un effet stabilisant du Mg^{2+} ayant été observé sur les protéines capable de lier les nucléotides [24], il semble envisageable que ce sel stabilise en particulier le domaine déshydrogénase présentant le site de liaison au FAD. Selon cette hypothèse, la stabilisation d'un seul des domaines de la protéine découplerait alors la transition unique obtenue en absence de l'effet exercé par le $MgCl_2$. La double dénaturation observée pourrait alors être expliquée par la stabilisation du domaine DH uniquement et la première transition serait ainsi attribuée au domaine TM uniquement.

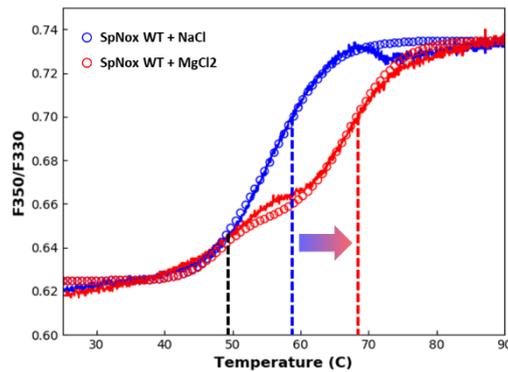


Fig.3.2.30 : Ajustement des courbes de thermostabilité en absence ou présence de MgCl₂ 0.25M à l'aide d'un modèle à deux domaines. (-) Courbes expérimentales, (o) Ajustement à l'aide d'un modèle à deux domaines. Les ajustements sont réalisés en supposant pour les deux courbes deux dénaturations : une première avec un T_m de 48.7° et un deuxième avec un T_m de 57°C en absence de MgCl₂ (bleu) à et 68°C en présence de MgCl₂ (rouge). Les pointillés noirs indiquent le T_m supposé indépendant du MgCl₂, les bleus indiquent le T_m de la seconde transition en présence de NaCl seul et les rouges indiquent le T_m stabilisé par le MgCl₂. La flèche indique la stabilisation du second T_m en présence MgCl₂.

Afin de vérifier cette hypothèse, un ajustement a été réalisé à l'aide d'un modèle à deux transitions correspondants aux dénaturations successives des domaines respectifs de SpNox afin de reproduire les profils de dénaturation. Les T_m ainsi que l'amplitude de chacune des transitions du modèle doivent ainsi être adaptées afin d'ajuster de manière adéquate les courbes de dénaturation expérimentales. Les paramètres définis pour l'ajustement, selon des T_m respectivement fixés à 48.7°C et à 68°C ainsi qu'un ratio d'amplitude entre les deux transitions de 0.25 permettent de générer une courbe se superposant strictement au profil mesuré en présence de MgCl₂. De plus le profil obtenu en absence de MgCl₂, qui ne semble présenter qu'une seule transition visible, peut également être reproduit avec le modèle à deux domaines en conservant un premier T_m à 48,7°C, un ratio d'amplitude de 0.25 et en réduisant la valeur du second T_m de 68°C à 57°C (Fig.3.2.30).

Ainsi la présence d'une unique transition visible sur le profil de dénaturation pourrait en réalité correspondre à la résultante des dénaturations indépendantes de chacun des domaines dont les T_m seraient trop proches ou indistinguables en absence de MgCl₂. D'après les résultats l'ajout de MgCl₂ ne semble ainsi impacter uniquement la stabilité du domaine attribué à la seconde transition. Enfin le rapport d'amplitude entre les deux transitions, défini à 1/4 pour pouvoir reproduire le profil de dénaturation, pourrait être en accord avec le nombre respectif de tryptophanes contribuant au signal nanoDSF dans chacun des domaines de SpNox : 1 dans le DH et 5 dans le TM, proche du ratio 1/4.

2. Test d'activité enzymatique

Le MgCl₂ semblant induire un effet stabilisant pour l'un des domaines de la protéine, par extension ce paramètre pourrait exercer une influence à l'échelle de la protéine entière et contribuer à favoriser la cristallogénèse de SpNox. Ainsi de manière similaire aux études préalables, la concentration optimale en MgCl₂ a été criblée au sein du tampon de purification afin d'atteindre des conditions associant activité et une stabilité optimale.

L'activité cytochrome c réductase de la protéine a ainsi été évaluée sur une gamme de concentration en MgCl₂ dans les mêmes conditions que les tests de thermostabilité (Fig.3.2.31.a).

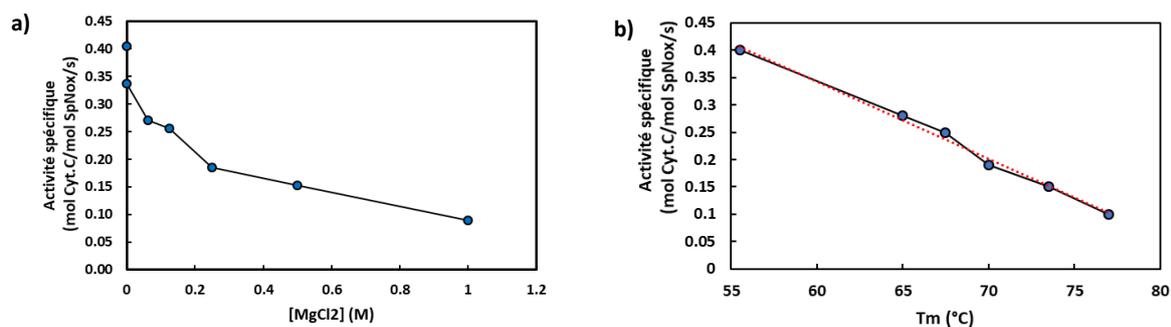


Fig.3.2.31 : Caractérisation de l'activité spécifique de SpNox WT en présence de MgCl₂. Suivi spectrophotométrique (A_{550nm}) de la réduction du cytochrome c par l'O₂ en fonction du temps (a). Corrélation de l'activité spécifique de SpNox WT en fonction de la température de dénaturation extraite par nanoDSF tous deux mesurés lors de l'augmentation de la concentration en MgCl₂ (b).

L'activité spécifique de la protéine diminue avec une concentration croissante en sel (Fig.3.2.21.a) avec 0,40mol de cytochrome c réduit.mol⁻¹ de SpNox.s⁻¹ sans MgCl₂ contre 0,09mol de cytochrome c réduit.mol⁻¹ de SpNox.s⁻¹ en présence de 1M MgCl₂. La présence de sel semble donc altérer l'activité enzymatique de la protéine, en accord avec la bibliographie [5].

De plus, l'évolution des résultats d'activité enzymatique en fonction des Tm mesurés dans les conditions identiques montre forte corrélation, indiquant que la supplémentation de MgCl₂ au sein du tampon de purification entraîne une réduction de l'activité de SpNox inversement proportionnelle à l'augmentation de la thermostabilité (Fig.3.2.31.b). La perte d'activité observée avec la stabilisation de la protéine pourrait ainsi indiquer que la stabilisation d'un des domaines de SpNox observé en présence de MgCl₂ résulterait d'une réduction de la flexibilité inter-domaine au sein de la protéine et nécessaire à sa fonctionnalité. Cette hypothèse peut être envisagée en accord avec l'activité de SpNox catalysant un transfert d'électron entre les domaines et impliquant probablement un rapprochement, lorsque la protéine active, des deux domaines afin de permettre une interaction entre le DH et certaines boucles du TM.

Pour limiter la perte d'activité afin de caractériser la protéine dans des conditions compatibles avec son état physiologique, tout en optimisant la thermostabilité, une condition intermédiaire de 0.2M MgCl₂ est ainsi sélectionnée pour des tests initiaux de cristallisation.

3. Test de cristallisation en présence de MgCl₂

Des tests de cristallisation manuelle par diffusion de vapeur ont ainsi été réalisés en présence de 0.2M de MgCl₂ supplémentant la condition identifiée initialement pour l'obtention de cristaux. Les cristaux obtenus (Fig.3.2.32) ont été pêchés et sont en attente de caractérisations aux rayons X au synchrotron SOLEIL.



Fig.3.2.32 : Cristaux de SpNox 8mg/ml obtenus en MES pH6, Li₂SO₄ 0.15M avec 0.2M de MgCl₂. En raison du shutdown de l'ESRF durant l'année 2019, ces cristaux n'ont pas pu être testés en diffraction

D. Récapitulatif des stratégies pour améliorer la diffraction des cristaux de SpNox

Enfin certaines stratégies dont l'impact sur la cristallogénèse de divers paramètres a été évalué par cristallisation manuelle en diffusion de vapeur ont été répertoriées (Fig.3.2.33).

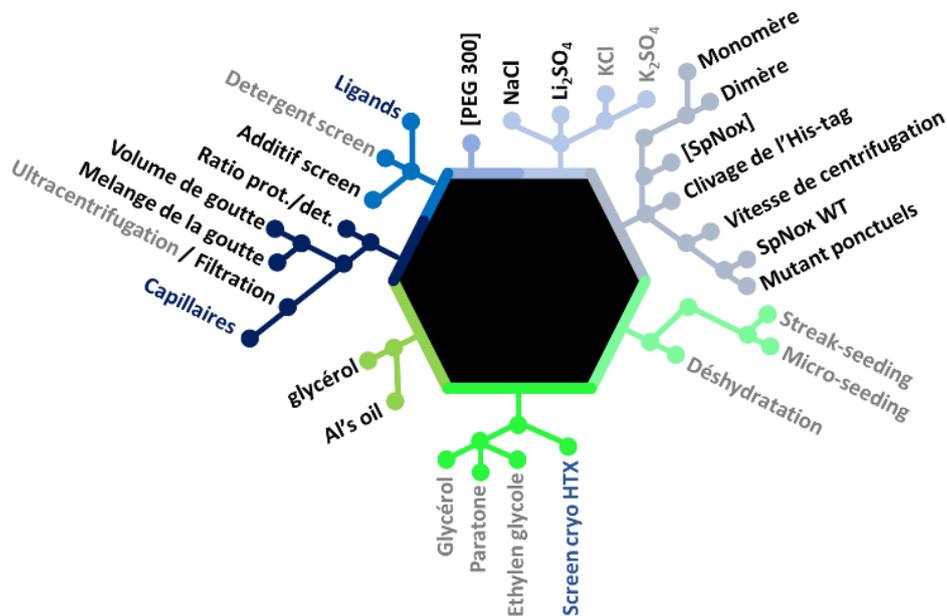


Fig.3.2.33 : Récapitulation de l'ensemble des stratégies testées pour tenter d'améliorer la qualité de diffraction des cristaux de SpNox. Les différentes stratégies sont regroupées par catégories concernant directement les protéines (—●—) (variation de concentration, clivage His-Tag, centrifugation, ...), les variations de sels (—●—), l'utilisation d'additifs de détergent (—●—), les variations concernant la goutte (—●—) (ratio, volume, mélange), l'utilisation d'un film d'huile pour retarder de nucléation (—●—), la Cryo-protection (—●—) et les techniques d'ensemencement et de déshydratations (—●—).

4. Mutations Stabilisantes de SpNox

Une stratégie alternative permettant d'améliorer la qualité de diffractions des rayons X par des cristaux de protéines consiste à rechercher des mutations stabilisantes au sein de la séquence protéique, par exemple en favorisant un état conformationnel de la protéine conduisant à une homogénéité supérieure, ou des mutations qui réduiraient la flexibilité de la protéine, par exemple pontage intra ou intermoléculaire.

A. Choix des mutations

Ainsi, des mutations ponctuelles ont été réalisées au sein du domaine DH de SpNox sur la base des travaux de Deng et al. [25] effectués sur des FNR de pois, une protéine homologue au domaine DH des NADPH oxydases, où un résidu tyrosine (Y308) spécifique a été identifié comme stabilisant le site isoalloxazine du cofacteur FAD et régulant l'accès de celui-ci au substrat NADP⁺ lors du processus réactionnel. Les mutants pour lequel ce résidu aromatique Y a été substitué (Y308W ou Y308S) stabilisaient le FAD ou le NADP⁺. Ainsi, le mutant Y308S permet une occupation de 100% du site de liaison NADP⁺ contre 35% pour l'enzyme sauvage, conduisant à la sélection d'une conformation structurale au sein de laquelle la protéine est co-cristallisée avec le substrat (Fig.3.2.34.a), permettant un gain d'homogénéité et une forte augmentation du pouvoir de diffraction par rapport aux cristaux de l'enzyme sauvage. A l'inverse, la substitution du résidu Y par un tryptophane empêche, par interaction du W avec le FAD, la fixation du NADP⁺ au sein de son site de liaison et permet de favoriser une conformation où le substrat est absent de la FNR (Fig.3.2.34.b)

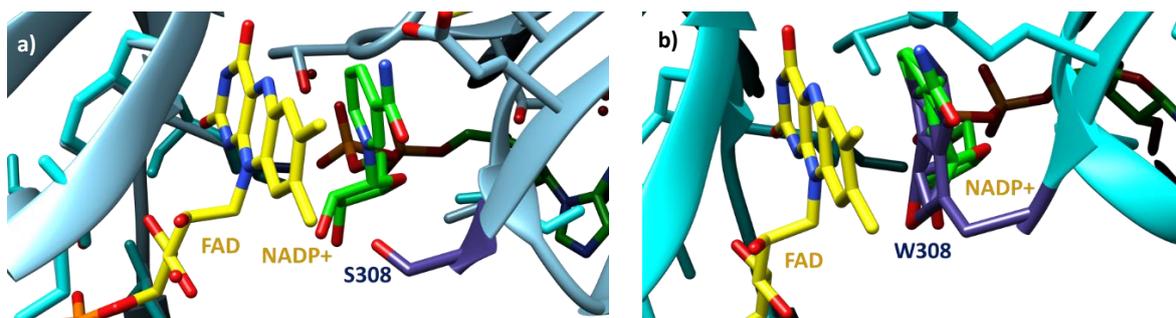


Fig.3.2.34: Identification des mutations ponctuelles S308 et W308 de la FNR. La structure 1QFZ du mutant Y308S permet de visualiser la liaison NADP+ - FAD constitutive chez le mutant S (a). La structure 1QGA du mutant Y308W permet de visualiser l'interaction entre le résidu W308 (bleu) avec le FAD (jaune) empêchant la liaison du NADP+ (vert) (a).

L'alignement de séquences entre les deux protéines homologues ainsi que d'autres séquences NADPH oxydases eucaryotes et procaryotes, a permis l'identification de deux résidus phénylalanine potentiellement équivalents à la tyrosine 308 de la FNR au sein du domaine DH de SpNox, respectivement situés aux positions hautement conservées 397 et 399 et qui pourraient exercer ce rôle de régulateur de l'accès du NADPH au FAD au sein du site actif. La promiscuité des résidus F397 et F399 ne permet pas de choisir laquelle de ces phénylalanines pourrait plus probablement influencer les interactions avec le FAD et le NADPH. Ainsi, par analogie avec les FNR, des mutations ponctuelles ont été réalisées, en substituant indépendamment chacun des deux résidus phénylalanine respectivement par des résidus W ou S conduisant ainsi à la réalisation des variants F397S et F397W ainsi que F399S et F399W (Fig.3.2.35). La présence d'un W pourrait permettre en raison de l'encombrement stérique du résidu de limiter l'accès au site NADPH conduisant ainsi à la co-cristallisation en présence de FAD seul au sein de l'enzyme bloquée dans la conformation où le substrat est absent. La substitution par un résidu S plus petit, pourrait faciliter l'accès au NADPH et ainsi stabiliser ce dernier au sein du site actif et permettre la co-cristallisation de l'enzyme dans un état plus proche de la forme active en présence de son substrat et permettrait ainsi d'obtenir des informations sur l'organisation des cofacteurs permettant le transfert d'électrons et apportant des éléments utiles à l'étude mécanistique

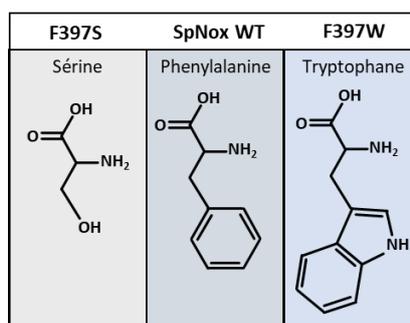


Fig.3.2.35 : Schéma des F397 ou F399 identifiés comme potentiels homologues de la tyrosine Y308 mutée dans la FNR et des résidus de substitution au sein des mutants F397S et F397W. Le tryptophane est plus volumineux que la phénylalanine initiale tandis que la sérine présente un encombrement stérique moindre.

B. Expression et caractérisation des mutants SpNox F397W, F397S, F399W, F399S

Les membranes comportant les formes mutées de SpNox ont montré des spectres différentiels similaires à celui obtenu avec SpNox WT, témoignant d'un contenu en hèmes comparable au sein des différentes versions de la protéine et indiquant ainsi que les mutations n'ont pas d'influence sur l'intégration du cofacteur hémique et que le domaine transmembranaire a probablement un repliement identique pour tous les mutants de SpNox (Fig.3.2.36).

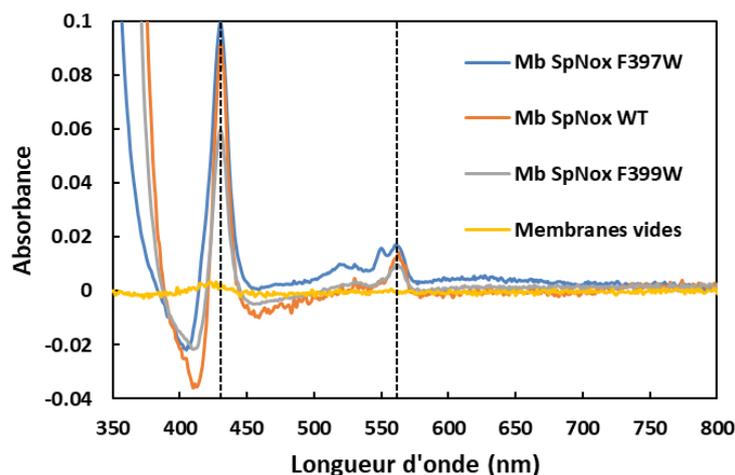


Fig.3.2.36 : Comparaison des spectres différentiels réalisés sur SpNox WT et sur les mutants F397 et F399 afin de vérifier la présence d'hèmes fonctionnels. Les spectres sont réalisés sur les protéines purifiées de F397W, F397S, F399W et F399W. Pour faciliter la lecture, seuls les spectres de F397W et F399W sont comparés sur le graphique avec SpNox WT

Afin d'évaluer la fonctionnalité des mutants F399S et F399W, les activités oxydoréductases des protéines purifiées ont été mesurées pour des concentrations croissantes de NADPH afin d'extraire l'affinité K_{mNADPH} des mutants pour le substrat (Fig.3.2.37).

Les résultats obtenus sur les mutants F399W et F399S montrent que les substitutions réalisées n'ont pas d'impact significatifs sur les affinités de la protéine pour le NADPH par rapport à SpNox WT. Ainsi il ne semble pas que le résidu Phe399 soit directement impliqué dans la liaison du substrat NADPH et qu'aucun de ces mutants permettent de stabiliser la protéine dans une conformation fixe empêchant le renouvellement du substrat au sein de son site de liaison. Ces mutants ne semblent donc pas présenter des caractéristiques distinctes de SpNox WT et ne conféreront probablement pas d'avantage pour la cristallisation de SpNox.

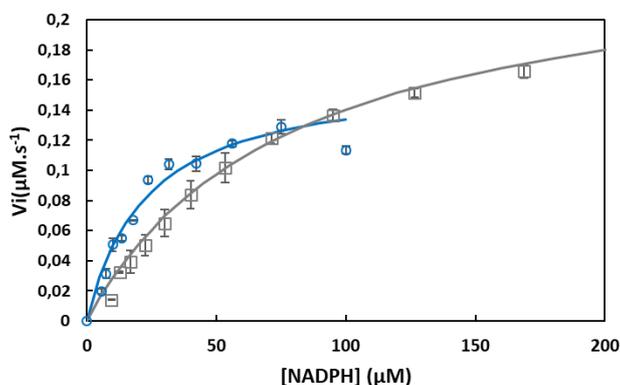


Fig.3.2.37 : Caractérisation de l'affinité de SpNox WT et F399W pour le NADPH. Les courbes de Michaëlis et Menten obtenues sur SpNox WT (o) et F399W (□) obtenues sur une gamme de concentrations croissante de NADPH démontre que le W399 impacte peu l'affinité de la protéine pour le NADPH. Les traits pleins correspondent aux ajustements obtenus à partir des paramètres K_m et V_m calculés sur Prism.

Afin d'évaluer la fonctionnalité des mutants de F397, les activités oxydoréductases de F397S et F397W ont été caractérisées après purification, et révèle que, dans les conditions optimales de mesure d'activité, le mutant F397S présente une activité spécifique 3 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage, tandis que l'activité NADPH oxydase de F397W n'est pas détectée (Fig.3.2.38.a). Cependant, l'ajout d'un excès de NADPH en concentration dix fois supérieure aux conditions usuellement introduites montre que l'activité de F397W est partiellement restaurable (Fig.3.2.38.b). Ces résultats

semblent ainsi indiquer que l'intégrité des deux mutants purifiés est préservée. La perte d'activité constatée au sein du mutant F397W pourrait être induite par la stabilisation du NADPH au sein de son site actif par le résidu W dont le cycle aromatique pourrait réaliser des interactions de stacking avec l'adénosine du NADPH, diminuant ainsi le renouvellement du substrat oxydé, ou intervenir par encombrement stérique en limitant l'accès du NADPH au site actif conduisant à une inhibition de l'activité. Au sein du mutant F397S, la présence du résidu sérine occupant un espace réduit par rapport à la phénylalanine initiale autoriserait un turnover plus efficace du substrat au sein de l'enzyme, conduisant ainsi à une amélioration de l'activité. Afin de vérifier ces hypothèses, des mesures d'affinité pour le NADPH ont été réalisées sur les deux mutants purifiés.

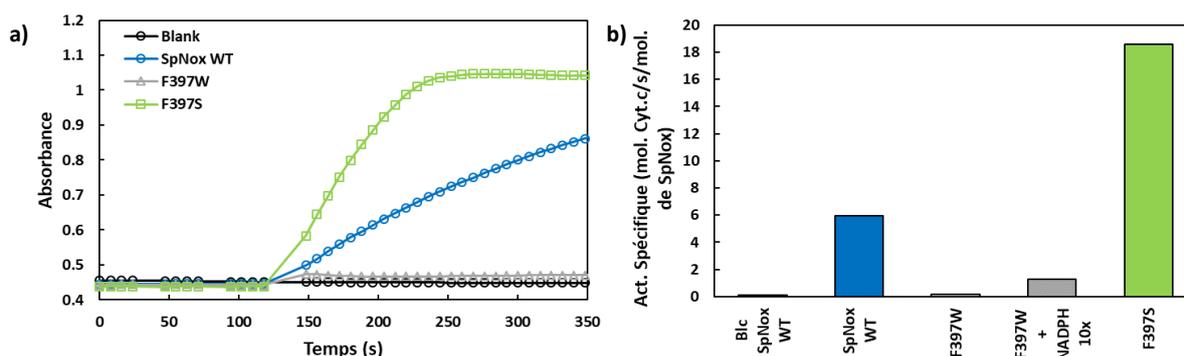


Fig.3.2.38 : Caractérisation de l'activité cytochrome c réductase des protéines SpNox WT, SpNox F397S et F397W. (a) Suivi de l'absorbance à 550nm du cytochrome c réduit en présence de 10µM FAD, 200µM NADPH et 1µg de SpNox WT (bleue), F397W (gris) et F397S (vert). Un contrôle négatif est réalisé en absence de protéine (noire). (b) Activité spécifique des protéines SpNox WT, F397W et F397S en présence de 10µM FAD, 200µM NADPH.

Les mesures d'affinité des mutants pour le NADPH, déterminées par évaluation du K_m sur une gamme croissante de substrat, révèlent que F397W présentent une affinité 190 fois plus élevée que la protéine sauvage (Fig.3.2.39.a) tandis que l'affinité de F397S est réduite 1.27 fois par rapport à SpNox WT (Fig.3.2.38.b) confirmant ainsi les hypothèses précédentes. La stabilisation du NADPH dans son site de liaison pour le mutant F397W pourrait ainsi permettre d'améliorer l'homogénéité des protéines impliquées dans les contacts cristallins et donc de réduire la limite de résolution des cristaux de SpNox.

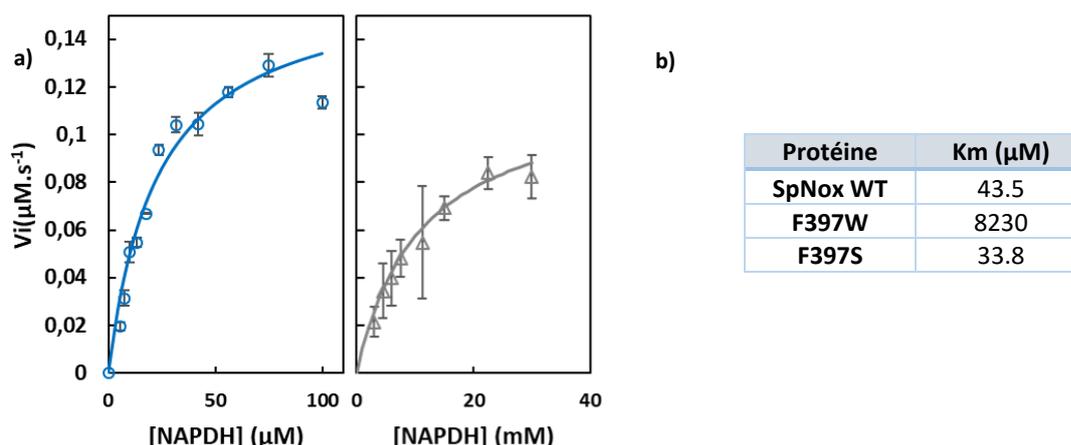


Fig.3.2.39 : Caractérisation de l'affinité de SpNox WT et F397W pour le NADPH. La courbe d'affinité de SpNox pour la NADPH témoigne d'un K_m de 43.5µM (gauche) tandis que la courbe obtenue pour le mutant F397W correspond à une affinité inférieure de 190 fois (droite) (a). Valeurs de K_m mesurées pour SpNox WT, F397W et F397S (b). Les courbes en trait plein correspondent aux ajustements obtenus à partir des paramètres extraits par Prism

C. Cristallisation des mutants SpNox F397W et F397S

Les meilleures conditions identifiées pour la cristallisation de SpNox WT ont été reproduites sur les mutants F397W et F397S. Cette approche a conduit à la croissance de nombreux gros cristaux hexagonaux bien définis (Fig.3.2.40.a,b) indépendamment du mutant testé.

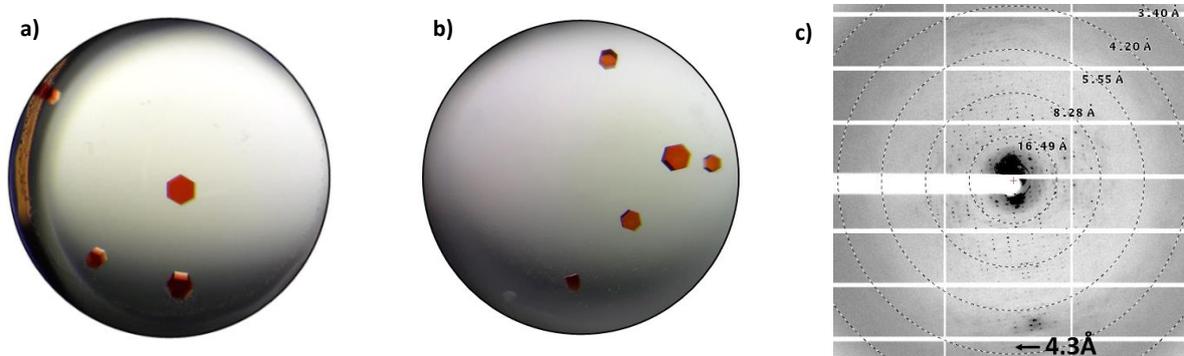


Fig.3.2.40 : Cristaux de SpNox F397S et F397W et cliché de diffraction du meilleur cristal de SpNox F397W. (a) Cristaux de F397W obtenus à 8mg/ml, MES pH6, NaCl 0.1M Li₂SO₄ 0.15M 30.5% PEG300. (b) Cristaux de F397S obtenus à 8mg/ml, MES pH6, NaCl 0.15M Li₂SO₄ 0.15M 30% PEG300. (c) Cliché de diffraction pour le cristal central (a) montrant des taches de diffractions à 4.3Å (c).

Les données de diffractions collectées sur le meilleur cristal obtenu avec le mutant F397W montre une limite de diffraction de 4.3Å correspondant à une amélioration de 0.2Å par rapport au meilleur cristal de SpNox WT (Fig.3.2.39.c). Bien que cette acquisition ne représente pas une amélioration significative de la limite de résolution absolue, l'ensemble des données de diffraction collectées automatiquement sur la ligne de lumière Massif-1 de l'ESRF révèlent que 20% des cristaux de F397W et 15% des cristaux de F397S présentent une limite de résolution entre 4Å et 5Å (Fig.3.2.40.a,b) contre seulement 6% des cristaux de SpNox WT obtenus dans les conditions optimales de cristallisation.

Ces résultats semblent témoigner d'une amélioration globale de la qualité de diffraction des cristaux résultant potentiellement d'un effet stabilisant des mutants.

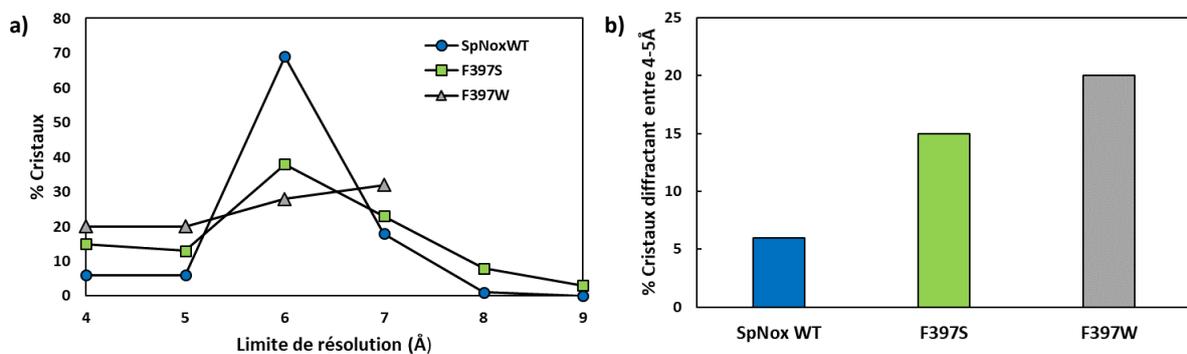


Fig.3.2.41 : Pourcentages de cristaux par gamme de résolution de 1Å obtenus pour SpNox WT, F397S et F397W. Les pourcentages de cristaux par tranches sont calculés par rapport au nombre total de cristaux ayant diffractés par mutant/sauvage SpNox WT (bleu) F397S (vert) et F397W (gris).

5. Conclusion

Au cours de cette étude de cristallogénèse, des progrès significatifs ont été réalisés concernant la qualité de diffraction des cristaux de SpNox par rapport aux caractérisations initialement réalisées (Fig.3.2.42)

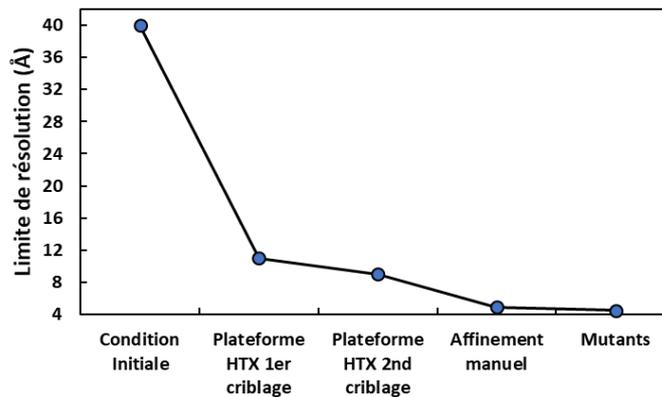


Fig.3.2.42 : Amélioration de la limite de diffraction des cristaux de SpNox réalisés au cours de ce projet grâce à l'utilisation d'une approche itérative.

Ainsi l'approche adoptée pour la cristallisation de SpNox a impliqué le criblage haut débit d'un nombre conséquent de conditions initiales dont l'analyse optimale a nécessité le développement d'un processus itératif, apportant à chaque nouvelle étape une information permettant l'amélioration continue du processus de cristallogenèse en marge de l'approche classique basée sur des processus d'essais/erreurs coûteux en temps et en échantillon et apportant peu d'information sur la manière d'améliorer les conditions de cristallisation en cas d'échec.

Ainsi le modèle statistique développé pour analyser l'ensemble des résultats de criblage a permis une première amélioration de la qualité de diffraction, l'extraction des influences indépendantes et codépendances de chaque facteur sur la cristallogenèse et la mise en évidence d'une condition de cristallisation optimale constituant un point de départ pour la réalisation d'affinements manuels systématiques afin d'optimiser les paramètres de cristallogenèse pouvant influencer la diffraction des rayons X tels que la taille, la cinétique et la qualité de l'empilement cristallin.

Cette stratégie, associée au développement d'un outil d'analyse de ces principaux paramètres a conduit à la réalisation d'un diagramme de phase facilitant l'identification des conditions conduisant à de gros monocristaux reproductibles qui se sont traduits par une amélioration de la limite de diffraction très encourageante dans l'objectif de résoudre la structure de SpNox.

Enfin, afin de surmonter la barrière de résolution associée à la protéine membranaire, la mise au point de nombreuses stratégies d'amélioration de la croissance cristalline ont été effectuées, mettant en évidence des voies d'amélioration prometteuses, notamment grâce à l'identification de mutants de SpNox stabilisant le cofacteur au sein de la protéine. Ces approches ont ainsi permis une amélioration de la qualité globale des cristaux.

En parallèle de ces nouvelles approches, une étude structurale basse résolution a été réalisée sur la protéine entière afin de mettre en évidence l'existence éventuelles de caractéristiques intrinsèques de la protéine pouvant expliquer les difficultés de cristallisation rencontrées.

3

Etude structurale basse résolution de SpNox

Le chapitre suivant constitue la version en cours de soumission au journal Biophysical Journal d'un article présentant une étude structurale basse résolution par diffusion des neutrons aux petits angles SANS de SpNox solubilisée à l'aide du détergent LMNG, dont la contribution au signal de diffusion des neutrons peut être complètement annulée en se plaçant dans un milieu deutéré à 21%.

Afin de vérifier que les échantillons présentent un degré d'homogénéité compatible avec les contraintes expérimentales imposées par l'utilisation de la technique de diffusion de neutrons aux petits angles, une analyse SEC MALLS a été réalisée.

Cette étude a permis l'acquisition d'un modèle correspondant à l'enveloppe globale de la NADPH oxydase procaryote entière en solution, mettant en évidence l'existence d'une flexibilité significative entre les domaines DH et TM de la protéine dans ces conditions.

Contributions : L'analyse SEC-MALS a été réalisée sur la plateforme PAOL de l'IBS et la caractérisation SANS a été réalisé à l'ILL. Le modèle d'homologie de SpNox a été développé en collaboration avec le professeur S. Smith de l'université de Kennesaw (Géorgie, USA).

Mes contributions à cette étude : J'ai conduit et rédigé les études de thermostabilité et d'activité sur SpNox. En collaboration avec le professeur Susan Smith, j'ai également développé le modèle d'homologie de SpNox. J'ai participé à certaines étapes de préparation et caractérisation biochimique de l'échantillon deutéré et participé à la caractérisation structurale et à l'analyse des résultats de SANS. J'ai participé à la réalisation de l'ensemble figures de cet article, en réalisant directement les figures 1-4 et 7, et en contribuant à la réalisation de la figure 5.

Interdomain flexibility within NADPH oxidase revealed by SANS using LMNG stealth-carrier.

Annelise Vermot^{1,†}, Isabelle Petit-Härtlein^{1,†}, Cécile Breyton¹, Aline Le Roy¹, Michel Thépaut¹, Corinne Vivès¹, Martine Moulin², Michael Härtlein², Sergei Grudinin³, Susan M. E. Smith⁴, Christine Ebel¹, Anne Martel^{2,*}, Franck Fieschi^{1,*}.

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institut de Biologie Structurale, 38000 Grenoble, France; ²Institut Laue Langevin, 38000 Grenoble France; ³INRIA, 38000 Grenoble France; ⁴Department of Molecular and Cellular Biology, Kennesaw State University, Kennesaw, GA, USA.

[†]These two authors contributed equally to the work.

*Correspondence: martela@ill.fr or franck.fieschi@ibs.fr

Summary

For the challenging structural determination of integral membrane proteins (IMP), small angle neutron scattering (SANS) allows obtaining important low-resolution structural information, specific deuteration providing a ‘stealth’ carrier for the solubilized IMP. We used SANS to determine a structural envelope of the prokaryotic *Streptococcus pneumoniae* NADPH oxidase (NOX) SpNOX, a model system for exploring structure and function of eukaryotic NOXes. SpNOX was solubilized in the detergent Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG), allowing optimal SpNOX stability and activity. Using deuterated solvent and protein, the LMNG was completely matched-out in SANS. It provides a cost-effective method for obtaining novel structural information on IMPs. Combining SANS data with molecular modelling provided a first structural characterization of an entire NOX enzyme. It revealed a distinctly less compact structure than that predicted from the docking of homologous crystal structures of the separate transmembrane and dehydrogenase domains, consistent with a flexible linker connecting the two domains.

Key words

Small angle neutron scattering, SEC-SANS, Membrane protein, NOX, nano-differential scanning fluorimetry, protein stability, contrast matching, protein flexibility.

INTRODUCTION

More than half of the drugs used in human health target integral membrane proteins (IMPs), including signalling or pathogen attachment receptors, channels, and enzymes. Design of new drugs and therapies greatly benefits from good protein structural information (1), but structure determination of IMPs present a challenge because of their limited recombinant expression, low natural abundance, difficulty of purification and functional study outside their membrane environment. Multidomain IMPs, and those that participate in complex assemblies, pose even more problems for structural study: solution NMR is limited to small proteins and is thus hampered in membrane protein studies by the additional size contributed by their solubilizing carrier (bound detergents, amphipatic polymers, nanodiscs, etc...); cryo-EM is an increasing solution but still requires proteins or complexes of a large molecular weight and is thus not always possible; and X-ray crystallography is limited to crystallizable proteins, trapped in a unique conformation. Small angle neutron scattering (SANS), though a low-resolution method, fills an important need when investigating conformational changes and/or multicomponent assemblies in IMPs (2).

SANS addresses samples in solution, so IMPs must be solubilized and purified. IMP solubilisation uses detergents that shield their hydrophobic transmembrane region from aqueous solution. Because detergent can destabilize IMPs, over the last decades tremendous effort has gone into the development of both new detergents and alternative IMPs carrier systems such as nanodiscs (3). At first glance, detergent binding presents a problem for SANS, because all components – the IMP(s) and the bound detergents (or an alternative carrier) – produce scatter. Scattering amplitude is related to the neutron scattering length density of each component: protein, detergent, lipid if any, and buffer. In turn, the amplitude (or the neutron scattering length density) strongly depends on the chemical composition of molecules and particularly of hydrogen content. Because of the hydrogen dependence, SANS offers the possibility, by selective deuteration of the solvent and/or components within the membrane protein complex, to mask a specific component, *e.g.* the detergent, and focus on the IMP structure. The contrast match point (CMP) of the detergent, or carrier, is the % of D₂O in the buffer that allows masking. The heterogeneous structure of lipids and detergents may lead to ordered scattering density fluctuations on a length scale comparable to the macromolecule extension and thus generate residual signals at their CMP. We have shown that a fluorinated surfactant could be entirely masked and are thus particularly appropriate for studying membrane multi-protein complexes by SANS (4, 5). Recently another elegant investigation allowed the observation of several conformation states of an ABC transporter using masked ‘stealth carrier’ nanodiscs, composed of lipid and membrane scaffold protein (MSP) (6). This approach required solvent with 100% D₂O, 100% deuterated membrane scaffold protein, and selectively deuterated phosphatidyl choline produced using a genetically engineered bacterial strain – a prodigious undertaking inaccessible to most labs (7, 8).

Here we explore the use of Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG), as an alternative to these approaches for studying IMPs by SANS. LMNG is an increasingly popular detergent for membrane protein studies (9–11). LMNG is composed of two *N*-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) molecules linked at the junction between the hydrophilic and hydrophobic moieties. LMNG thus contains two acyl-chains, like most natural membrane lipids, rendering it much less disruptive to IMPs than classical single chain detergents, *e.g.* the reference DDM. We recently demonstrated that LMNG can be completely matched out in SANS: in a solvent with 21.4 % D₂O, the LMNG micelle contribution is undetected (11). This unique feature, and the fact that LMNG improves IMPs stability, make it a good candidate to become a novel versatile stealth carrier for solution studies of IMP. In these studies, IMP should be at least partially deuterated, which is reasonably accessible for proteins overexpressed in bacterial and yeast sources.

Our group has long studied NADPH oxidases (NOX), a family of complex multidomain, and sometimes multicomponent, enzymes (12–14). NOXes are transmembrane flavocytochromes that catalyse the production of reactive oxygen species associated with diverse downstream physiological outcomes ranging from hormone synthesis, balance, cardiovascular tone regulation and innate immunity. The range of pathologies impacted by NOX make this family a drug target of high value for pharmaceutical companies. We are particularly interested in the neutrophilic NOX complex essential to innate immunity in humans. In the phagocytic cell, NOX2 is activated to generate the ‘respiratory burst,’ producing superoxide anion initiating a cascade up to the production of microbicidal hypochloride. Activation includes the assembly of several cytosolic components -p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} and Rac- onto the membranous flavocytochrome b₅₅₈. The latter is composed of the catalytic subunit NOX2 and an essential accessory transmembrane subunit p22^{phox}. Structural information exists for domains, or entire proteins, of the cytosolic factors (15–22), along with some data regarding association between these cytosolic factors (23). For the transmembrane component of this complex, however, structural data are scarce and very little is known about how assembly leads to enzyme activity. The SANS signal matching strategy described above is particularly suited to decipher the structural organization of such a complex. With this objective in mind, a first step, before studying such a complex, is to find the study conditions compatible with the membrane component.

Recently, we demonstrated the existence of prokaryotic NOXes (24), which we sought as model systems of eukaryotic NOXes with similar structure and function but increased purification yield and stability. Our idea has been well supported: we identified SpNOX, a NOX homolog from *Streptococcus pneumoniae*, that expresses well in *E. coli*, yields of large amounts of purified protein, and remains active in detergent solution (24). The main difference between SpNOX and its eukaryotic counterpart reside in its independence to additional factor for activity. Otherwise, as the eukaryotic NOXes, SpNOX is composed of two domains: a transmembrane cytochrome that binds two hemes (TM domain), and a cytosolic dehydrogenase domain that holds an FAD molecule and binds the NAD(P)H electrons donor (DH domain (DH domain)) (Fig.1). Despite significant effort, we have not yet succeeded in obtaining crystals of full-length SpNOX diffracting at high resolution. Another group recently provided the most complete crystal structures for the NOX family when they separately crystallized the transmembrane domain and dehydrogenase domain of CsNOX, a NOX5 homolog from cyanobacteria (25). Docking of the two separate domains provides a model of the entire protein, but even so, to date no crystal structure of an entire NOX has been obtained. SANS characterization of SpNOX can provide new information regarding the structural specificities of the full-length enzyme.

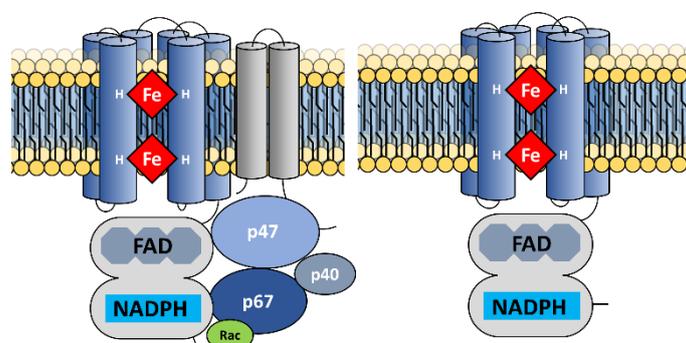


Fig.1: Organization of NOX enzymes and related complexes. (A) Organisation of neutrophilic NADPH oxidase complex composed of the membrane catalytic subunit NOX2, p22^{phox}, the cytosolic factors p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} and Rac. (B) The bacterial NADPH oxidase from *Streptococcus pneumoniae*, SpNOX, a prototype of NOX enzymes organized in two domains, the heme-containing transmembrane domain (TM), and the cytosolic dehydrogenase domain (DH) containing flavin cofactor and NAD(P)H binding site.

Here we thus used the SpNOX protein as a prototype NOX family member for SANS structural investigation. With NanoDSF, we confirmed LMNG as the detergent providing the highest stability to SpNOX among the commercially available members of the neo-pentyl glycols detergents. We screened conditions to establish the best combination for both structure stability and activity of SpNOX. We elaborated a SANS strategy involving both SEC-SANS and static-SANS to ensure homogeneity and monodispersity of the sample. We confirmed that LMNG contribution to the SANS signal can be entirely matched out by use of an appropriate buffer, allowing us to detect uniquely the deuterated protein contribution. We adapted a software to combine SANS data with molecular modelling, and provided a first structural characterization of an entire NOX enzyme. This work underlines the great potential in the use of LMNG micelle as a general stealth carrier for future IMPs SANS studies. It also reveals that the conformation of the entire NOX enzyme shows differences from the conformation expected from the structures of its two isolated domains.

MATERIALS & METHODS

Cloning and expression of hydrogenated and deuterated His-SpNOX.

The synthetic SpNOX gene optimized for expression in *E. coli* including polyhistidine tag and thrombin cleavage site was amplified via PCR and subcloned into pET-30b (Novagen) between the NdeI/ BamHI sites. Unlabelled His-SpNOX was induced in *E. coli* C41(DE3), grown in LB medium supplemented with 50 mg L⁻¹ kanamycin, by addition of 0.2 mM IPTG (at OD₆₀₀ of 1.2) followed by culture for 3.5 hours at 37°C. Cells were harvested by centrifugation. Using the same expression system, match-out deuterated His-SpNOX was produced in the Institut Laue-Langevin Deuteration Laboratory (D-Lab), Grenoble, France, following established protocols for high cell-density cultures in deuterated minimal medium (26, 27). After adaptation of cells to deuterated minimal medium (28) a 100 mL flask culture was grown in Enfors medium containing 85% D₂O, 5 g L⁻¹ unlabelled glycerol and 35 mg L⁻¹ kanamycin to inoculate a fermenter culture in a 3L fermenter (Labfors 2, Infors, France). During the batch and fed-batch phases, the pH/D was adjusted to 6.9 by addition of NaOD (Eurisotop, France) and the temperature was adjusted to 30 °C. When the OD₆₀₀ reached a value of about 12, His-SpNOX expression was induced by 0.5 mM IPTG and pursued for 20 h. Cells were then harvested and stored at -80 °C. From 2 fermenter runs, 108g (wet weight) of deuterated cell paste were obtained.

His-SpNOX purification

Membrane preparations were performed as described previously (24). Membrane pellets (typically 12 x 1 mL aliquots containing 20 mg protein) were solubilized to 0.6 mg/mL in 50 mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 5 mM (0.5%) LMNG (NG310-MNG), 10 µM FAD (unless otherwise noted), incubated overnight with shaking at 4°C. Insoluble material was removed by ultracentrifugation at 235,000 g for 45 min at 4°C. The two-step purification, done at 4°C, was automated on an Akta Xpress (GE Healthcare), the solubilized supernatant was loaded on a 1 mL equilibrated HisTrap HP Prepacked Column (GE Healthcare); the column was washed with 50 mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 0.1 mM LMNG, 10 µM FAD, 90 mM imidazole. The protein was eluted with 0.025 mM LMNG and 300 mM imidazole in the same buffer. The 4 mL elution peak was then automatically loaded on a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE Healthcare) previously equilibrated with 50 mM Tris pH 7.0, 300 mM NaCl, and 0.025 mM LMNG. The size exclusion chromatography (SEC) profile displays a main peak corresponding to His-SpNOX monomer. The selected fractions were concentrated by ultrafiltration (Amicon Ultra-4 cutoff 50 kDa). When DMNG or DDM was used as a detergent, the same purification protocol was followed but with adjustment of detergent concentrations in the buffers. Those were previously described for DDM (11). In the case of DMNG, detergent concentrations in the solubilisation buffer were 5.3 mM, while it was 0.21 mM for the elution buffer of the Ni-HisTrap and the SEC.

His-Tag cleavage.

We used commercial thrombin immobilized on agarose (Thrombin CleanCleave™ Kit, Sigma-Aldrich). The manufacturer's protocol was adapted to increase the cleavage yield: the resin was washed thrice by centrifugation in the cleavage buffer; 200 µL of packed resin was re-suspended with 700 µL of 10X cleavage buffer; 6 mL SpNOX at 0.1 mg/mL were added, before incubation overnight at 4°C on a rotating wheel. The cleaved protein, named Tagfree-SpNOX, was recovered by gravity, and its solvent exchanged on a desalting column (PD10 column ref 17-0851-01, GE Healthcare), before concentration.

Thermostability studies using NanoDSF instrumentation

Thermal stability assays were performed using a Prometheus NT.48 instrument (NanoTemper Inc., Germany). 50 μl of sample per conditions were prepared to perform experiments in triplicates. Standard-treated glass capillaries filled by capillarity with 10 μl of sample were loaded into three sets of 16-capillary sample holders yielding up to 48 conditions inserted into the instrument. The excitation at 280 nm was optimized to yield emission intensities of intrinsic fluorescence at 330 and 350 nm, in the absence of heat gradient, in the range of 5000 and 16,000 A.U. The temperature gradient was set to an increase of 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in a range from 15 $^{\circ}\text{C}$ to 95 $^{\circ}\text{C}$. Protein unfolding was measured by detecting the temperature-dependent change in the ratio of fluorescence emission at 350 nm vs 330 nm. Protein aggregation was detected by measuring back-reflected light intensity, reflecting light scattering. The fluorescence ratio vs. time was fitted with 8th order polynomial function and the 1st derivative of this function. The melting temperature was then determined by detecting the maximum of the first derivative of the fluorescence ratio. Repeatability of experimental results revealed an accuracy of the melting temperature extracted by this method of ± 1.5 $^{\circ}\text{C}$ (Supplementary data). Samples used for testing pH impact on stability were done by diluting 10 times concentrated SpNOX solution (at 8 mg mL^{-1}) in the following 0.1 M buffers depending on the tested pH: citric acid buffer for pH 4, 5, 5.5 and 6; sodium acetate for pH 4.5; bis tris-propane for pH 6.5 and 8, Pipes for pH 7; Tris for pH 7 and 7.5; Bicine buffer for pH 9 and CAPS buffer for pH 9.5. In all cases, LMNG concentration was kept at 0.025 mM.

Cytochrome C reductase enzymatic activity

SpNOX activity was monitored by following cytochrome c reduction as previously described (24), except that 1 μg of protein was used in 1 mL total reaction volume and the temperature was 25 $^{\circ}\text{C}$. Results are expressed as moles of reduced cytochrome c per mole of SpNOX per second.

Data analysis of thermostability and activity assays

The results from thermostability and activity assays were analysed simultaneously using the JMP® statistical software (Version 13.0. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019) to plot 2D contour plots of T_m and activity as a function of pH and salt concentrations. The median of triplicates was used to compute the charts, and linear interpolations were done in between measurement points to fill the charts. A 2D linear interpolation was performed on thermostability and activity results as a function of pH and salt concentration using Python® to produce a 3D chart (see Supplementary data Fig.S3).

Sequence alignment and structure-based sequence alignment

A large set of 549 NOX homolog sequences distributed about evenly between prokaryotes and eukaryotes, was aligned using MAFFT (29). The sequences were split into transmembrane (TM) and dehydrogenase (DH) domains identified by homology. Each domain was realigned separately with Promals3D (30). The TM alignment was constrained to the crystal structure of CsNOX TM domain (5O0T) while the DH alignment was constrained to the crystal structure of CsNOX DH domain (5O0X) and DH domain homologs 1GJR, 1FNB, 1GVH, 2EIX, 3A1F; all other parameters were at default values. The resulting multiple alignments were inspected in Jalview (31); those with missing secondary structural elements or with unusually large insertions were removed and remaining sequences were pruned to 91% (TM domain) or 95% (DH domain) identity. The final sequence sets (TM domain: 172 sequences and DH domain: 207 sequences) were realigned in Promals3D with default parameters and the same structural constraints specified above.

Homology model generation

The sequences of the SpNOX TM and DH domains were independently submitted for structural modelling to the I-TASSER server (32). For the TM domain we constrained I-tasser with the TM domain of CsNOX. I-tasser identified 4EH1 (FAD/NAD binding domain of nitric oxide dioxygenase) as the closest homolog to the SpNOX DH domain. Resulting models were visualized and structurally superimposed onto the corresponding CsNOX crystal structures using Chimera (33). The D-loop of the SpNOX TM model was reconstructed using SuperLooper (34) with A¹¹⁰ and W¹²¹ as respectively N-terminal and C-terminal anchors. The highest scoring loop with similar orientation to that of CsNOX was accepted. The homology model including the remodelled D-loop was compared to the structure of CsNOX TM domain in Chimera via the Matchmaker tool with default values. The homology models of the TM and DH domains of SpNOX were docked together by structurally aligning each domain to the

docked structures of the CsNOX TM and DH crystals (25) using the Chimera Matchmaker feature; the docked CsNOX structure was generously provided by Dr. Magnani.

SANS samples and measurements

SpNOX SANS signal was measured using two sample environments on ILL SANS-D22. For static measurement, using the classical 22-position sample changer, His-SpNOX was prepared according to the following protocol: After the preparative SEC, fractions corresponding to a monomeric form were pooled. Fractions contaminated with a dimeric form were combined, concentrated and re-injected on Superdex 200 10/300, to recover a second pool of monomer fractions. The two monomer pools were mixed, concentrated, and injected on Superdex 200 equilibrated with a buffer containing 21.4% D₂O. One fraction (OD₂₈₀ = 1.23) was measured in SANS without further treatment. The other monomer fractions were pooled and concentrated by a factor of ≈ 7 to OD₂₈₀ = 3.36. The Tagfree-SpNOX was prepared in the same way, except that the thrombin cleavage was performed before the last SEC in 21.4% D₂O, leading to a sample with OD₂₈₀ = 2.979. The SANS signal of these samples was measured in Hellma suprasil quartz cells 100QS with 1-mm optical path length. The sample temperature was kept at 10 °C during the exposure times. Scattering data were recorded at two instrumental detector/collimator configurations, 2 m/2.8 m and 5.6 m/5.6 m, using a neutron wavelength of $\lambda = 6 \text{ \AA} \pm 10\%$. At each instrumental configuration, the neutron flux reaching the sample is precisely measured, as well as the direct beam transmission, the scattering of a Boron-enriched material, the scattering and transmission of an empty cell, all buffers and all samples. The exposure times varied between 20 and 120 min.

For measurement by SEC-SANS (35): 11mL of His-SpNOX from the preparative SEC (see above) were concentrated to obtain 270 μL of protein at 7.5 mg/mL and a volume of 250 μL was injected, at 12°C, on a Superdex 200 increase column of the SEC-SANS set up. The equilibration buffer was 50 mM Tris-HCl pH7, 300 mM NaCl, 10 μM FAD, 0.025mM LMNG, 21.4% D₂O. An intermediate configuration is used to cover the Guinier range of the curve: 4m collimation and 4m sample-detector distance, still with a wavelength of $\lambda = 6 \text{ \AA} \pm 10\%$. Individual patterns of an exposure time of 30 s were continuously recorded along the elution, and averaged later to generate sample and buffer patterns. Calibration, data corrections and reduction are the same as for SANS in cuvette. UV was acquired at 280, 416 (maxima of absorption of SpNOX), 380, and 450 nm. Fractions of 10 drops ($\approx 0.89 \text{ mL}$) were collected.

SANS Data Reduction

The neutron flux at sample position was used to calibrate scattering intensity to absolute scale. The empty beam transmission was used to set the centre of the patterns and to calculate the transmission of the empty cell, the buffers and the samples. The scattering of the piece of boron-enriched material, absorbing the totality of the beam flux, was subtracted from all other patterns, as it results from ambient and electronic noise. The raw data were reduced (detector efficiency, electronic and empty cell background subtraction, angular averaging, transmission and thickness correction) using GRASP software package (<https://www.ill.eu/users/support-labs-infrastructure/software-scientific-tools/grasp/>). The scattering curves measured at the two different configurations and covering different but overlapping q ranges were merged ($q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$) and the respective buffer signals were subtracted using SANS reduction macros written by S. Kline for Igor software (36). The radii of gyration (R_g) and the intensities scattered in the forward direction ($I(0)$) of all samples were extracted by the Guinier approximation, with $R_g \cdot q \leq 1.3$, using the program Primus (37).

SANS data Analysis

Ab initio shape reconstruction: The program DAMMIF (38) was used to generate low resolution envelopes of SpNOX from the SANS data. Data up to $q_{\text{max}} = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ were included. The DAMMIF input files were generated using the program GNOM (39), imposing the restraints $p(r = 0) = 0$ and $p(r = D_{\text{max}}) = 0$ for the pair distance distribution function $p(r)$. For each sample, the values of D_{max} were varied to obtain the best fit of the data and a smooth $p(r)$ curve. As a quality control, the radii of gyration determined from the pair distribution analyses were compared with the ones determined by the Guinier analysis. 13 DAMMIF models were generated, and all were suitable for averaging using DAMAVER (40).

Model-based analysis: The program Pepsi-SANS was used to tune our homology model to fit the SANS data. This software can rapidly generate a multitude of models along the slowest normal modes computed for the starting structure (32), calculate their scattering curves, and compare them with experimental data (after smearing them by the instrumental resolution). Its approach follows the observation that most protein functional motions can be well

described with just a few collective coordinates computed using the normal mode analysis.(41) Adapted from Pepsi-SAXS (31) to SANS data (absolute intensity and experimental smearing), Pepsi-SANS software can be downloaded at <https://team.inria.fr/nano-d/software/pepsi-sans/> or used online at <https://pepsi.app.ill.fr/> to calculate scattering profiles from a crystallographic structure or model in pdb format.

SEC-LS

SEC-LS experiments were conducted at 4 °C on a HPLC consisting of a degasser DGU-20AD, a LC-20AD pump, an autosampler SIL20-AC_{HT}, a communication interface CBM-20A and a UV-Vis detector SPD-M20A (Schimadzu, Kyoto, Japan), a column oven XL-Therm (WynSep, Sainte Foy d'Aigrefeuille, France), a static light scattering miniDawn Treos, and a refractive index Optilab rEX detectors. The analysis was made with the software ASTRA, v5.4.3.20 (Wyatt, Santa-Barbara, USA). Samples of 100 µL of F12, F13, F14 from the SEC-SANS experiment, were injected at 0.5 mL min⁻¹ on a Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), equilibrated with 50mM Tris-HCl pH8, 300mM NaCl, 10µM FAD, 0.025 mM LMNG. Bovine serum albumin at 2 mg mL⁻¹ in PBS buffer was injected as a control.

Numerical values used for SEC-LS and SANS analysis

The calculated molar masses of His-SpNOX and Tagfree-SpNOX are 48.081 and 46.527 kDa, respectively. Weighed samples of two independently purified preparations of His-SpNOX and Tagfree-SpNOX of known absorbance at 280 nm were subjected to acid hydrolysis for 24 h at 100 C and quantitative amino acid analysis was performed in a Biochrom 30 (Biochrom). The extinction coefficient at 280 was calculated to be 107066 M⁻¹cm⁻¹ +/- 10% (*i.e.* 2.227 and 2.301 (mg/mL)⁻¹cm⁻¹ pour His-SpNOX and Tagfree-SpNOX, respectively). His-SpNOX concentration in the SEC-SANS profiles was estimated as c (mg mL⁻¹) = 1.315 A_{450} , derived from the extinction coefficient and the absorbance spectrum of an eluted fraction. The refractive index increment $\partial n/\partial c = 0.1938$ mL g⁻¹ and partial specific volume $\bar{v} = 0.75$ mL g⁻¹ were calculated from amino acid sequence in the program Sedfit (free available in <https://sedfitsedphat.nibib.nih.gov>. For LMNG, $\partial n/\partial c = 0.146$ mL g⁻¹ (11). We calculate a scattering length density for 70% deuterated SpNOX, calculated from the mass obtained by MALDI-TOF, in 21.4 % D₂O and considering 80 % of the exchangeable H exchanged, of 3.1 10¹⁰ cm g⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of SpNOX Sample

We determined the thermostability and aggregation propensity of purified His-SpNOX in a range of conditions to find optimum buffer conditions for SANS using nanoDSF technology. We followed simultaneously the ratio of the fluorescence emitted at 350 and 330 nm (F₃₅₀/F₃₃₀), which reports protein folding state, and from which melting temperature (T_m) is extracted, and light back-scattering, which reports protein aggregation. From a preliminary set of measurements at different protein concentrations from 0.8 to 8.2 mg/mL, the SpNOX concentration was found to greatly impact the unfolding curve appearance and thus the extracted melting temperature (T_m) due to concomitant aggregation (Supplementary data Fig.S1 and S2). As a compromise, the working concentration for further experiments was set close to 1 mg mL⁻¹.

Detergent screening for optimal stability and minimal aggregated state.

The choice of detergent is crucial to maintain the stable structure of membrane proteins. (42) In addition, for studying IMPs in SANS, the detergent should allow good cancellation of its scattering contribution. In the fluorinated detergent, F6-Diglum, previously characterized in our group to be entirely masked at its match-point (5), SpNOX was inactivated and aggregated (data not shown). LMNG, which also presents a matching point allowing good cancellation of its scattering contribution in SANS (11), was identified as a good detergent for SpNOX (11) (24). This makes the Maltose Neopentyl Glycol detergent

class of particular interest. LMNG possesses two linked lauryl-chains. However, Decyl Maltose Neopentyl Glycol (DMNG), with reduced aliphatic chains, which leads to a smaller detergent belt, may offer a promising alternative. We thus assessed the stability of His-SpNOX in LMNG, DMNG, and also DDM as a reference. As shown in Figure 2, His-SpNOX purified in LMNG has a T_m 9°C higher than DMNG and 20°C than DDM. Similarly, an improved aggregation temperature (T_{agg}) was noticed for LMNG, 21°C higher than DMNG and 25°C higher than DDM. According to these results, LMNG is confirmed as the most appropriated detergent to promote the overall stability of SpNOX for biophysical studies.

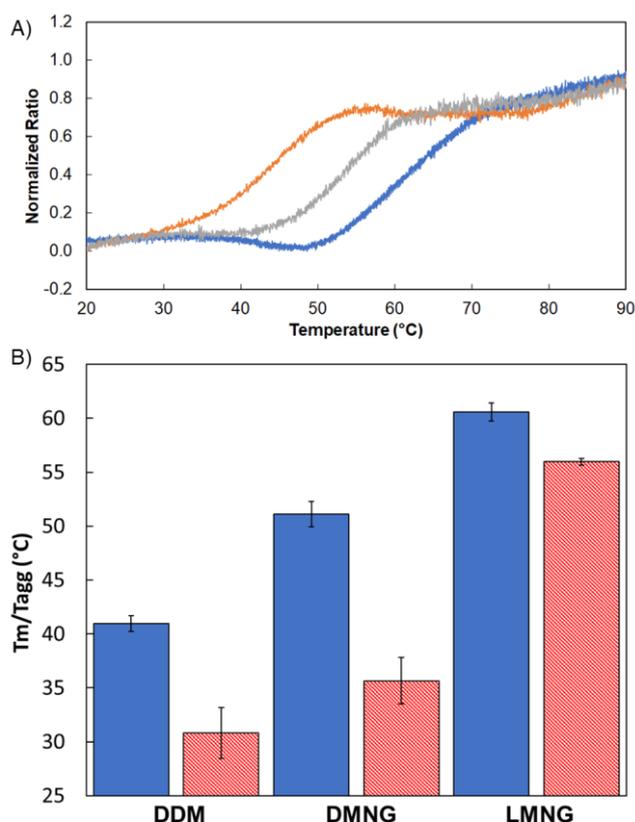


Fig.2: Optimisation of SpNOX thermostability in detergent. (A) Normalized thermal unfolding curves of His-SpNOX (0.8 mg mL^{-1}) in the presence of 300 mM NaCl for several detergents : DDM (orange), DMNG (grey), LMNG (blue). (B) Summary of T_m (°C) (blue) and T_{agg} (°C) (red) measured for DDM, DMNG and LMNG.

Salt/pH screen to optimize SpNOX thermostability

Changes in pH and salt concentrations can modulate the charges within proteins, (43) thus influencing protein stability. His-SpNOX thermostability was assessed through wide ranges of pHs and salt concentrations. The thermal unfolding curves monitored show an increase of T_m when increasing NaCl concentrations or decreasing pHs. Figure 3 shows a 2D contour plot combining the influence of both pH and salt concentration on SpNOX stability and demonstrates the existence of a thermostable plateau for $\text{pH} < 7$ and $[\text{NaCl}] > 200 \text{ mM}$ with T_m higher than 60 °C.

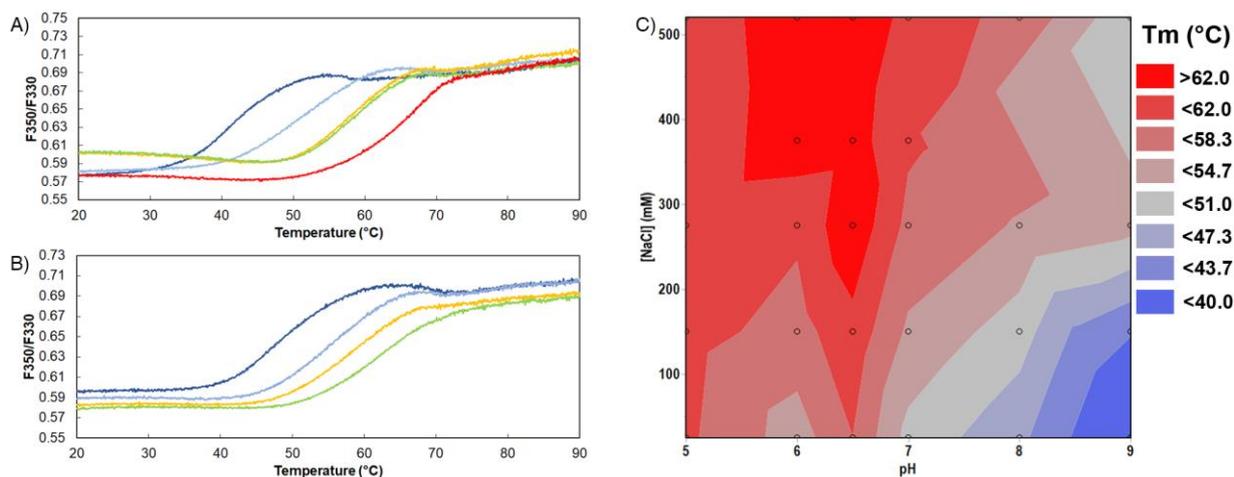


Fig.3: Optimisation of pH and salt concentration to promote SpNOX thermostability. (A) Thermal unfolding curves of SpNOX (0.8 mg mL^{-1}) in buffers containing 300 mM NaCl with various pHs (dark blue) pH 9, (light blue) pH 8, (orange) pH 7, (green) pH 6, (red) pH 5. (B) Thermal unfolding curves of His-SpNOX (0.8 mg mL^{-1}) in elution buffer at pH7 with NaCl concentrations (dark blue) 25 mM, (light blue) 150 mM, (orange) 275 mM, (green) 520 mM. (C) 2D contour representation of T_m dependence with pH and NaCl concentrations. Open symbols represent experimental data.

Maximizing SpNOX activity

We monitored activity of SpNOX in a range of salt and pH conditions. Figure 4 shows the activity of His-SpNOX in the same conditions of salt and pH as in Fig.3. The 2D contour plot of specific activity as a function of salt concentration and pH emphasizes the existence of a clear optimum at pH 7 and NaCl 250 mM, with progressive loss of activity with increasing distance from the optimum (Fig.3C). FAD from 0.01 to 100 μM had essentially no effect on the thermostability of SpNOX (data not shown). However, because supplementation with FAD was previously shown to be necessary for full activity of SpNOX (24), and due to its potential lability (it needs to be added in assays), to further strengthen the equilibrium in favour of FAD containing SpNOX, this cofactor was included; combined thermostability and activity analysis (integrated in Figure S2) allowed us to define an optimum buffer composition for SpNOX used throughout the study: 50 mM Tris-HCl pH7, 300 mM NaCl, 10 μM FAD, 0.025mM LMNG.

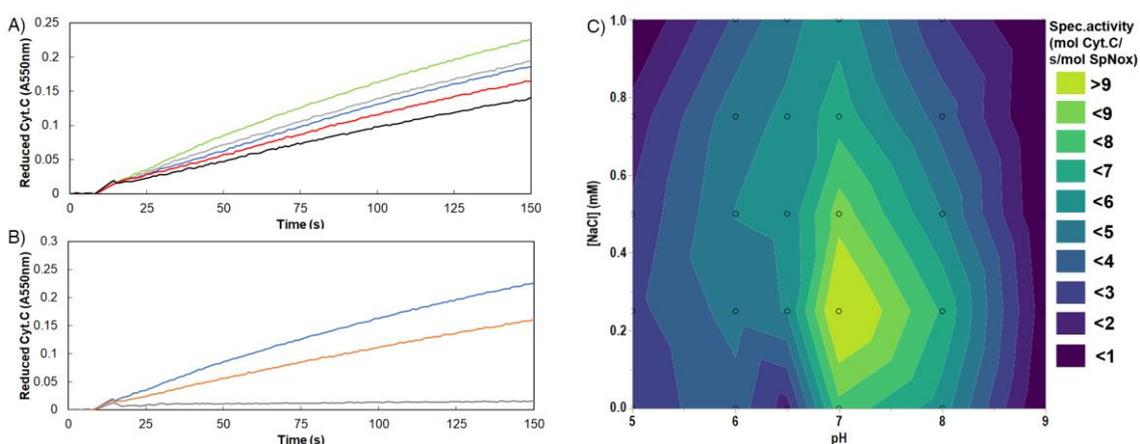


Fig.4: Optimisation of salt concentrations and pH to promote SpNOX cytochrome c reductase activity. (A) Monitoring of cytochrome c reduction in presence of SpNOX ($1 \mu\text{g}$) NADPH ($200 \mu\text{M}$) FAD ($10 \mu\text{M}$) in the elution buffer at pH 7 in presence of various NaCl concentrations (blue) 25 mM, (green) 250 mM, (grey) 500 mM, (red) 750 mM, (black) 1 M. (B) Monitoring of cytochrome c reductase activity with SpNOX ($1 \mu\text{g}$), NADPH ($200 \mu\text{M}$), FAD ($10 \mu\text{M}$), NaCl (300 mM), in presence of various pHs (grey) pH 9, (orange) pH 8, (blue) pH 7. (C) 2D contour representation of cytochrome c reductase specific activity dependence with pH and NaCl concentration. Specific activities are represented using a color scale corresponding to values expressed as mole of reduced cytochrome c per mole of protein per second. Open symbols represent experimental data.

SANS and SEC-SANS for deciphering the low resolution SpNOX structure

We then investigated the general structure of SpNOX in solution using SANS. To increase the contrast between hydrogenated proteins (calculated CMP $\sim 44\%$ D₂O) and LMNG (calculated CMP $\sim 21.4\%$ D₂O), we produced SpNOX in a deuterated form (calculated CMP $\sim 100\%$ D₂O). All the SANS experiments described below were performed with the deuterated protein. His-SpNOX was over-expressed in 85% D₂O; after solubilization and purification, the deuterated SpNOX had the same homogeneity and properties (absorption spectrum; specific activity), as the hydrogenated protein. The deuteration level of 70% of non-labile hydrogens was estimated on the purified fractions by MALDI TOF (Table S1). Sample monodispersity is essential in SANS because the scattering curve results from the scattering of all particles in solution. SEC-SANS was recently described (35) to improve SANS data collection for complex sample, providing data of sufficient signal-to-noise ratio, while at the same time circumventing aggregation.

SEC-SANS Experiments

The use of SEC-SANS was motivated by SpNOX moderate stability, and the evidence of minor amounts of aggregates after purification (11). Before injecting SpNOX, we first checked that LMNG does not scatter. Fig.5B reports the raw scattering measured at low angle after injection of LMNG at 25 mM , in the buffer containing 21.4% D₂O. We know that LMNG injected at 20 mM elutes as a very large peak between 10 and 15 mL , with a maximum at 12 mL (11). LMNG is thus clearly undetected. SpNOX in the last size exclusion chromatography purification step appears essentially homogeneous, but a left shoulder indicates aggregated species (Fig.5A). To avoid contamination by aggregates, SpNOX fractions of the second part of the main peak were pooled and concentrated to 7.5 mg mL^{-1} , before injection on the SEC column coupled to SANS. The chromatograms at 450 nm and for the scattering signal at low angle were superposed in Fig.5C. The flow rate was decreased when the protein came off the column, in order to increase SANS signal/noise for the homogeneous protein. When the initial flow rate was restored after $\approx 40\text{ min}$, a rapid decrease of the two signals was observed. The normalized scattering profiles from UV and SANS are nearly superimposed. A shoulder was still detected before the main SpNOX peak (Fig. 5C); its scattering/UV ratio is twofold that of the main peak, as observed in Fig. 5C comparing the scattering and UV signals at ≈ 26 and $\approx 36\text{ mL}$ s, indicating that the shoulder corresponds to a dimer of the species present in the main peak. The approximate elution times of the collected fractions 12, 13, and 14 are displayed on Fig.5C. They were analyzed after the SANS experiments by absorbance, SEC-LS, specific activity, MALDI TOF, SDS-PAGE, and thin layer chromatography. Results are shown in supplementary Table S1. While from SEC-LS, fractions F12 and F13 contain a significant proportion of dimer, fraction F14 is essentially homogeneous with 94% of monomer (Fig.S4). From A_{416}/A_{280} ratio and specific activity, the protein has the appropriate heme content and is fully active. The scattering profiles were averaged first in five “boxes”, indicated by colors on the SANS profile on Fig 5.C. The raw data are shown in Supplementary Fig.S5. The radii of gyration, R_g , and mean molar masses derived from Guinier plots are larger for boxes 1 and 2 (R_g of 34 and 31 \AA , molar masses of 110 and 70 kDa , respectively), than for boxes 3 to 5, where the values are constant. We thus averaged all the data corresponding to boxes 3 to 5. It corresponds to 28 minutes of measurement, with a mean concentration of 1.05 mg mL^{-1} , and provides $R_g=28.1 \pm 0.8\text{ \AA}$, and a molar mass of $49 \pm 1\text{ kDa}$, in agreement with the monomer value of 48 kDa .

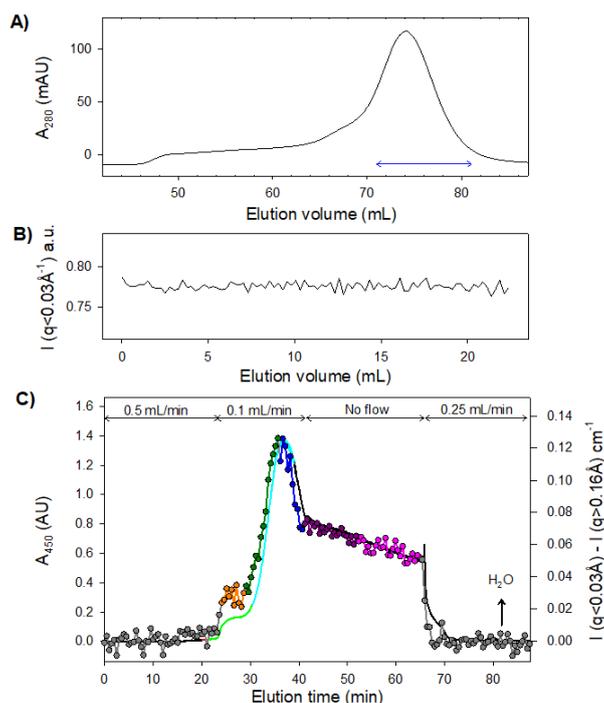


Fig.5 SEC-SANS experiment. (A) Preparative size exclusion chromatography profile of SpNOX, eluted on a HiLoad 16/600 Superdex 200 column, in 50 mM Tris-HCl pH7, 300 mM NaCl, 10 μ M FAD, 0.025mM LMNG. Fractions indicated by the blue arrow were pooled and concentrated for SEC-SANS. (B) SEC SANS of LMNG: Sum of the neutron counts measured at low angle, for 250 μ L of 25 mM LMNG injected on a Superdex 200 10/300 coupled to SANS, as a function of elution volume. Elution buffer and sample contained 21.4% D₂O. (C) SEC-SANS profiles, for 250 μ L of 7 mg mL⁻¹ SpNOX injected on the same column with the same buffer: Absorbance at 450 nm (black line) and scattering intensity difference between the low and large angles (grey line), as a function of elution time. Water elution volume was determined by its incoherent scattering (not visible in this graph), measured as an equal increase in the low and large angle counts. The flow rates are indicated on the top part of the panel. The chromatograms show an anomalous decreasing plateau at the right of the main peak: an air bubble was probably trapped, and the flow rate was decreased. The approximate elution volumes for fractions 12 (red, at \approx 20 min. elution, hardly seen on the plot because of the large flow rate), 13 (green) and 14 (cyan) are indicated on the A₄₅₀ profile. Profiles recorded at 280, 380, and 416 nm showed absorbance > 2. The data selected for averaging and named box 1 (orange), 2 (dark green), 3 (dark blue), 4 (dark pink), and 5 (pink) are indicated by colored lines and circles on the SANS profile.

Static SANS Experiments

Because SEC-SANS experiments can measure SpNOX at only moderate concentration, and because we demonstrated that the monomer can be obtained from SEC and preserved without dimer contaminant for hours, we decided to measure the scattering of the monomer of SpNOX in the usual static SANS configuration. His-SpNOX monomer was obtained from successive SEC, the last one being performed in 21.4 % D₂O, and followed by concentration *via* ultrafiltration. As a control, the scattering of a non-concentrated fraction of His-SpNOX was measured. The normalized scattering curves and that obtained from SEC-SANS are superimposed (Fig.S6). Downstream data analysis was performed with the scattering curve obtained with the best signal/noise, in static SANS and from the concentrated sample. To evaluate the effect of the His-Tag, a sample of SpNOX was prepared in the same way, but with thrombin cleavage of the His-Tag before the last SEC in 21.4 % D₂O. The scattering curves of the His-SpNOX and Tagfree-SpNOX are superimposed (Fig.S6). This confirms that the His tag contribution is too small to be detected.

SANS Analysis

SANS data analysis can be divided in three distinct parts. The first part consists in replotting the data under different classical graphs (Kratky plot, $p(r)$, Guinier) to highlight specific particularities of the structure such as its flexibility, its maximum dimension, its global shape, its R_g . This is a very robust analysis but it is not sufficiently informative. Providing a few assumptions verified by our pre-characterization (purity, monodispersity), we can reconstruct the shape of the molecule, either “ab initio”, using only SANS data, or by modifying a molecular model.

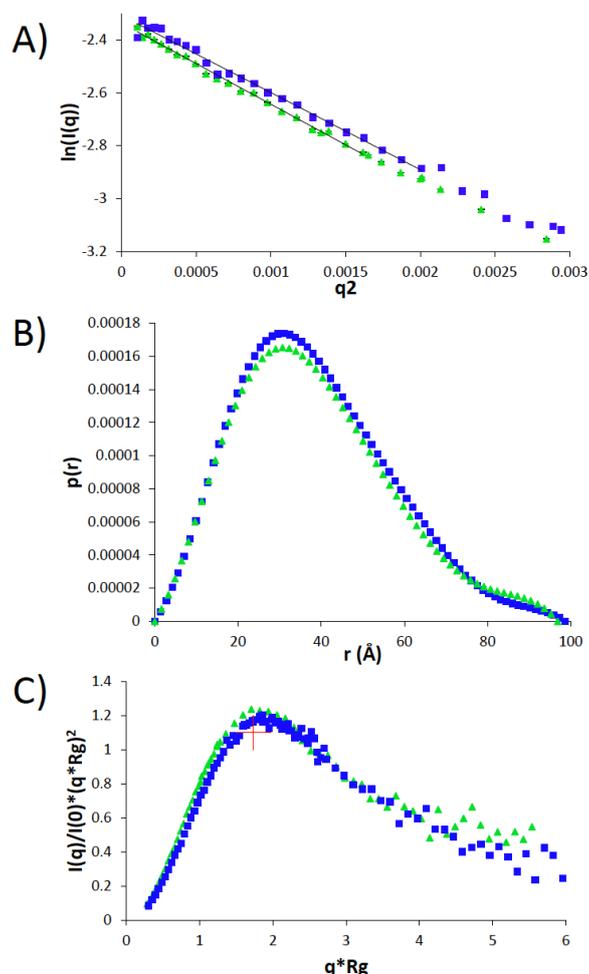


Fig.6: Analysis of the His-SpNOX (blue squares) and Tagfree-SpNOX (green triangles) scattering data in 21.4% D₂O. (A) Guinier analysis. For the Guinier fits (straight line), $R_g * q$ ranges from 0.30 to 1.30. Error bars are indicated. (B) Pair distance distribution function, $p(r)$ calculated using the program GNUM. (C) Dimensionless Kratky plot of the data. The red cross corresponds to $(\sqrt{3}; 1.1)$.

Fig. 6 presents results obtained from the first strategy (Statistical information on SANS analysis are given in Table S2). Fig.6A and 6B show the Guinier analysis and the $p(r)$ of the His-SpNOX and Tagfree-SpNOX curves. From the Guinier curves, we can extract a R_g of 29.6 \pm 0.4 Å for the His-SpNOX sample, and of 30.1 \pm 0.3 Å for Tagfree-SpNOX. Both $p(r)$ curves are also very similar, and can be fitted with a very similar D_{max} , showing no effect of the polyHis tag on the global dimension of the protein in solution. The dimensionless Kratky plot of the diffusion data gives valuable information on the flexibility of the protein in solution. A compact, globular, monodomain protein will display a bell shape curve with a maximum at $(\sqrt{3}, 1.1)$. The curves for SpNOX in solution, with or without tag, display a bell shape (Fig. 6C), but with a maximum greater than $\sqrt{3}$. This indicates a protein in solution with domains connected by a flexible link (44).

Comparison of SANS envelope to homology model

Good structural information for separated TM and DH domains of NOX proteins was made available by the x-ray crystallography of CsNOX (25). We used these structures as templates to generate a homology model of SpNOX TM and DH domain as described in materials and methods (Fig.7A and 7B). The previously proposed docking of the separately crystallized CsNOX domains provides initial information regarding the relative position of the domains, but in the docked structure the TM domain clashes with the predicted location of the adenosine phosphate part of FAD. The homology models of SpNOX that we built were also docked, with reference to the docked CsNOX structure. The docked SpNOX domains also shows clashes with FAD (Fig. 7C) and, in addition, between both DH and TM domain at their interface. This implies that the hinge region between the two domains in the full-length CsNOX, and by extension SpNOX, is likely to be somewhat different from the predicted conformation in the docked model.

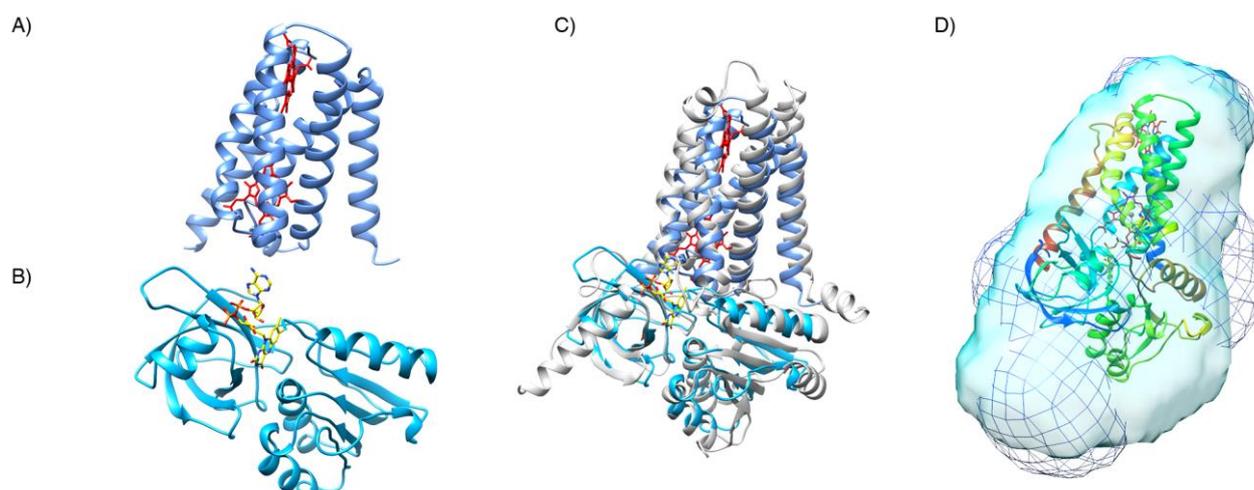


Fig.7: Homology model of (A) SpNOX TM domain, (B), DH domain and (C) SpNOX docked model structure (blue) constructed using CsNOX docked model (white, based on docked 500T and 500X from Magnani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 114: 6764–6769) as a template. (D) *ab initio* envelopes determined by SANS of His-SpNOX (surface) and Tagfree-SpNOX (mesh), calculated with the program Dammif. Both envelopes display a similar shape, with a Chimera correlation of 0.9158. They are superimposed with the full-length SpNOX model from C.

Figure 7D shows that our docked homology model (ribbon) is too compact to represent the solution structures obtained *ab initio* from SANS (surface or mesh). Therefore, the two domains of our docked SpNOX model were separated to break potentially wrong contacts and to enable a greater range of motion of the domains relative to each other. This over-open model was submitted to Pepsi-SANS, together with the SANS data, to generate a large number of conformations along the slowest normal modes, and compare their calculated scattering curve to the experimental SANS data. Fig.8A shows the docked homology model, the over-open homology model before and after the flexible fitting. One can notice that the TM domains of SpNOX from the docked model and from the *ab initio* envelopes superimpose well (Fig.8B), while the DH domain of SpNOX is moved compare to the DH domain position within the docked-model structure. Here the DH domain occupies a much larger volume. This suggests that SpNOX is flexible in solution and the DH domain is not tightly apposed and moves relatively to the TM domain (Fig.8B). This conclusion agrees well with the *ab initio* reconstructed envelope being much larger than the homology model and the interdomain flexibility suggested by the Kratky plot (Fig. 6C).

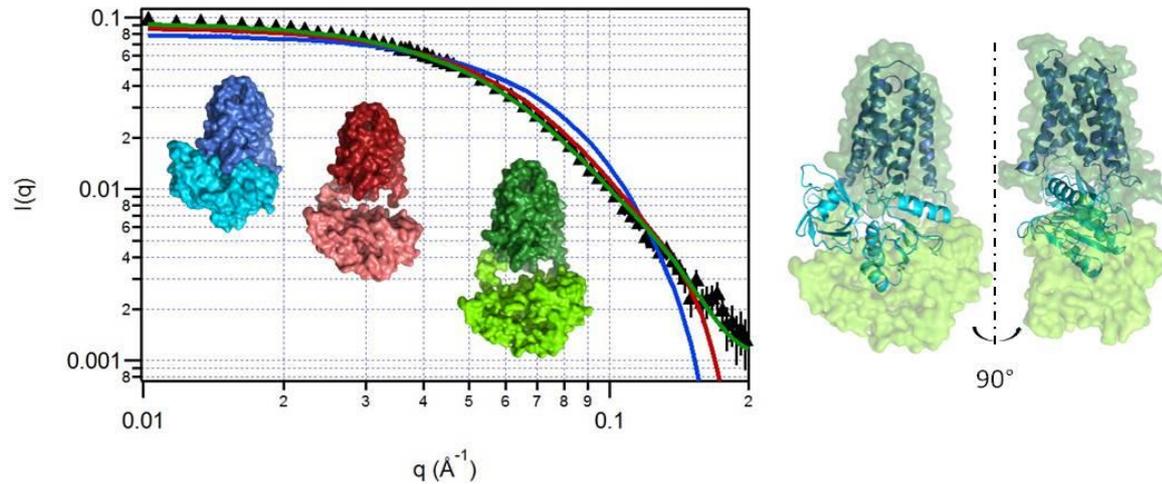


Fig.8 : Experimental SANS data of the tag-free SpNOX (black triangles), and calculated scattering curves (lines) of SpNOX docked homology model (blue), of over-open SpNOX homology model used before fitting (red), and of the best model resulting from flexible fitting along normal modes to the SANS data (green) (A). Their respective χ^2 values are 39.4, 7.8, and 0.7. B) The initial SpNOX docked model (cartoon representation) superimposed on best fit model (green, same as in A). This model is voluntarily depicted as a surface to prevent over-interpretation of the result from this low-resolution technique

Conclusion

This work underlines the great potential in the use of LMNG micelle as a general stealth carrier for future IMPs SANS studies. It opens many future prospects for the study of membrane proteins and membrane protein complexes by SANS. The approach detailed here is complementary to the method developed by Maric et al (7, 8) and applied by Josts et al (6) and Nitsche et al (45) using nanodiscs to stabilize membrane transporters. To cancel the nanodisc carrier contribution in their SANS experiments, the authors used stealth nanodisc, composed of matchout deuterated lipids and a matchout deuterated membrane scaffold protein invisible in 100% D_2O . The unlabelled membrane proteins to study were inserted into the deuterated nanodiscs. The work described here used exactly an inverse labelling strategy where the carrier used, commercial LMNG detergent, is not unlabelled and the SpNOX protein to study is deuterated. In our case, we benefit from the unique properties of LMNG to be matchout in 21.4% D_2O and here the labelling of the protein is performed to largely increase the scattering contrast. These two complementary methods, stealth nanodisc- or LMNG- carriers, provide broad applicability to SANS experiment whatever the heterologous expression system used for the membrane protein recombinant production. While production of deuterated protein is now straightforward using *E.coli* it is very challenging in higher eukaryotic expression system. In that last case the nanodisc approach will be preferred. The method documented here is particularly attractive since it uses a commercially available detergent, with high stabilizing properties towards membrane proteins, and an *E.coli* expression system for a well-established deuterated protein production, which have the higher yield/cost ratio.

Our work also highlights some new and unexpected properties of NOX enzymes. Comparison of homology modelling, *ab initio* envelopes and normal mode analysis of the model shows significantly different structural and conformational properties of full-length SpNOX compared to the model structure obtained *via* docking of the isolated domains, at least when studied in absence of its electron donor, NAD(P)H. The interdomain flexibility observed here in solution with the entire SpNOX construct at least partially explains why the full-length NOX proteins are so difficult to crystallize while the structure of the individual domains could be solved by X-ray crystallography. The unique structural information available to date was obtained from isolated domains of CsNOX, a prokaryotic algae homolog of human NOX5; no X-ray structure of a full-length NOX is yet available. The implications of a flexible linker between domains extends to structure-function studies of human NOXes. For example, only a handful of various chimera linking the TM of one human isoform to the DH of a different isoform have been functional (46, 47) ; electron transfer appears unusually sensitive to the exact structure of the interdomain linker. The B loop connecting TM helices 2 and 3, and the D loop connecting TM helices 4 and 5, represent the most extensive locations in the TM domain available for interaction with the DH domain. Activity of chimera in which the B and D loops are matched or mismatched to the DH isoform gave results apparently conflicting with experiments testing binding of B and D loop synthetic peptides matched or mismatched to the DH domain (48) ; varying flexibility in the linkers of the chimera may explain at least part of these discrepancies. If the flexibility of the interdomain linker and motion of the DH domain relative to the TM domain holds true for human NOXes, this provides a potential source of explanation on how component assembly affects enzyme activity.

Our stability and activity measurements of SpNOX in presence of detergent indicate that the observed flexibility of the enzyme does not interfere with its activity. However, the correct electrons transfer requires an optimum alignment of the redox cofactors present in both the DH and TM domain (the FAD and hemes respectively). Such flexibility is puzzling given that SpNOX, contrary to the eukaryotic NOX enzymes, do not need any additional factor to be activated. One possible explanation is that NADPH binding within the DH domain could induce proper docking of the DH onto the TM domain thus promoting an efficient electron transfer from NADPH to the final electron acceptor. Considering the protein concentration and the exposure times needed in SANS experiments on one side and the activity level of SpNOX on the other side, time-resolved SANS experiments, as recently carried out for the PAN proteasome system,(49) cannot be envisaged to validate this hypothesis. NADPH would be consumed too quickly. Further experiments using different approaches will be necessary to decipher one step further the mechanism of electron flow in SpNOX and also to evaluate the extent to which SpNOX models eukaryotic NOX enzymes.

Acknowledgment

SANS data presented here have been recorded on Institut Laue Langevin instrument D22 and are registered under DOIs *10.5291/ILL-Data.BAG-8-36*, *10.5291/ILL-Data.BAG-8-37* and *10.5291/ILL-Data.INTER-382*.

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE92-0001) to CE and CB and (ANR-17-CE11-0013) to FF, AV, IPH, MT. A. Vermot thanks her support through the Emergence program from the Univ. Grenoble Alpes.

References

1. Arinaminpathy, Y., E. Khurana, D.M. Engelman, and M.B. Gerstein. 2009. Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets. *Drug Discov. Today*. 14: 1130–1135.
2. Breyton, C., F. Gabel, M. Lethier, A. Flayhan, G. Durand, J.-M. Jault, C. Juillan-Binard, L. Imbert, M. Moulin, S. Ravaud, M. Härtlelein, and C. Ebel. 2013. Small angle neutron scattering for the study of solubilised membrane proteins. *Eur. Phys. J. E*. 36: 71.
3. Denisov, I.G., and S.G. Sligar. 2017. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem. Rev.* 117: 4669–4713.
4. Abla, M., G. Durand, C. Breyton, S. Raynal, C. Ebel, and B. Pucci. 2012. A diglycosylated fluorinated surfactant to handle integral membrane proteins in aqueous solution. *J. Fluor. Chem.* 134: 63–71.
5. Breyton, C., A. Flayhan, F. Gabel, M. Lethier, G. Durand, P. Boulanger, M. Chami, and C. Ebel. 2013. Assessing the conformational changes of pb5, the receptor-binding protein of phage T5, upon binding to its Escherichia coli receptor FhuA. *J. Biol. Chem.* 288: 30763–30772.
6. Josts, I., J. Nitsche, S. Maric, H.D. Mertens, M. Moulin, M. Haertlein, S. Prevost, D.I. Svergun, S. Busch, V.T. Forsyth, and H. Tidow. 2018. Conformational States of ABC Transporter MsbA in a Lipid Environment Investigated by Small-Angle Scattering Using Stealth Carrier Nanodiscs. *Structure*. 26: 1072-1079.e4.
7. Maric, S., N. Skar-Gislinge, S. Midtgaard, M.B. Thygesen, J. Schiller, H. Frielinghaus, M. Moulin, M. Haertlein, V.T. Forsyth, T.G. Pomorski, and L. Arleth. 2014. Stealth carriers for low-resolution structure determination of membrane proteins in solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70: 317–328.
8. Maric, S., M.B. Thygesen, J. Schiller, M. Marek, M. Moulin, M. Haertlein, V.T. Forsyth, M. Bogdanov, W. Dowhan, L. Arleth, and T.G. Pomorski. 2015. Biosynthetic preparation of selectively deuterated phosphatidylcholine in genetically modified Escherichia coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 241–254.
9. Chae, P.S., S.G.F. Rasmussen, R.R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, M.A. Goren, A.C. Kruse, S. Nurva, C.J. Loland, Y. Pierre, D. Drew, J.-L. Popot, D. Picot, B.G. Fox, L. Guan, U. Gether, B. Byrne, B. Kobilka, and S.H. Gellman. 2010. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods*. 7: 1003–1008.

10. Hardy, D., R.M. Bill, A. Jawhari, and A.J. Rothnie. 2016. Overcoming bottlenecks in the membrane protein structural biology pipeline. *Biochem. Soc. Trans.* 44: 838–844.
11. Breyton, C., W. Javed, A. Vermot, C.-A. Arnaud, C. Hajjar, J. Dupuy, I. Petit-Hartlein, A. Le Roy, A. Martel, M. Thépaut, C. Orelle, J.-M. Jault, F. Fieschi, L. Porcar, and C. Ebel. 2019. Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1861: 939–957.
12. Debeurme, F., A. Picciocchi, M.-C. Dagher, D. Grunwald, S. Beaumel, F. Fieschi, and M.-J. Stasia. 2010. Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly. *J. Biol. Chem.* 285: 33197–33208.
13. Li, X.J., F. Fieschi, M.H. Paquet, D. Grunwald, Y. Champion, P. Gaudin, F. Morel, and M.-J. Stasia. 2007. Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *J. Leukoc. Biol.* 81: 238–249.
14. Beaumel, S., A. Picciocchi, F. Debeurme, C. Vivès, A.-M. Hesse, M. Ferro, D. Grunwald, H. Stieglitz, P. Thepchatri, S.M.E. Smith, F. Fieschi, and M. José Stasia. 2017. Down-regulation of NOX2 activity in phagocytes mediated by ATM-kinase dependent phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.* 113: 1–15.
15. Grizot, S., J. Fauré, F. Fieschi, P.V. Vignais, M.C. Dagher, and E. Pebay-Peyroula. 2001. Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry.* 40: 10007–10013.
16. Grizot, S., F. Fieschi, M.C. Dagher, and E. Pebay-Peyroula. 2001. The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J. Biol. Chem.* 276: 21627–21631.
17. Groemping, Y., K. Lapouge, S.J. Smerdon, and K. Rittinger. 2003. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell.* 113: 343–355.
18. Marcoux, J., P. Man, I. Petit-Haertlein, C. Vivès, E. Forest, and F. Fieschi. 2010. p47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.* 285: 28980–28990.
19. Honbou, K., R. Minakami, S. Yuzawa, R. Takeya, N.N. Suzuki, S. Kamakura, H. Sumimoto, and F. Inagaki. 2007. Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.* 26: 1176–1186.
20. Lapouge, K., S.J. Smith, P.A. Walker, S.J. Gamblin, S.J. Smerdon, and K. Rittinger. 2000. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol. Cell.* 6: 899–907.
21. Wilson, M.I., D.J. Gill, O. Perisic, M.T. Quinn, and R.L. Williams. 2003. PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol. Cell.* 12: 39–50.
22. Karathanassis, D., R.V. Stahelin, J. Bravo, O. Perisic, C.M. Pacold, W. Cho, and R.L. Williams. 2002. Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* 21: 5057–68.
23. Ziegler, C.S., L. Bouchab, M. Tramier, D. Durand, F. Fieschi, S. Dupré-Crochet, F. Mérola, O. Nüsse, and M. Erard. 2019. Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 294: 3824–3836.

24. Hajjar, C., M.V. Cherrier, G. Dias Mirandela, I. Petit-Hartlein, M.-J. Stasia, J.C. Fontecilla-Camps, F. Fieschi, and J. Dupuy. 2017. The NOX Family of Proteins Is Also Present in Bacteria. *mBio*. 8.
25. Magnani, F., S. Nenci, E. Millana Fananas, M. Ceccon, E. Romero, M.W. Fraaije, and A. Mattevi. 2017. Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114: 6764–6769.
26. Haertlein, M., M. Moulin, J.M. Devos, V. Laux, O. Dunne, and V.T. Forsyth. 2016. Biomolecular Deuteration for Neutron Structural Biology and Dynamics. *Methods Enzymol.* 566: 113–157.
27. Dunne, O., M. Weidenhaupt, P. Callow, A. Martel, M. Moulin, S.J. Perkins, M. Haertlein, and V.T. Forsyth. 2017. Matchout deuterium labelling of proteins for small-angle neutron scattering studies using prokaryotic and eukaryotic expression systems and high cell-density cultures. *Eur Biophys J.* 46: 425–432.
28. Artero, J.-B., M. Härtlein, S. McSweeney, and P. Timmins. 2005. A comparison of refined X-ray structures of hydrogenated and perdeuterated rat gammaE-crystallin in H₂O and D₂O. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61: 1541–1549.
29. Katoh, K., J. Rozewicki, and K.D. Yamada. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20: 1160–1166.
30. Pei, J., B.-H. Kim, and N.V. Grishin. 2008. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* 36: 2295–2300.
31. Waterhouse, A.M., J.B. Procter, D.M.A. Martin, M. Clamp, and G.J. Barton. 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 25: 1189–1191.
32. Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9: 40.
33. Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* .
34. Hildebrand, P.W., A. Goede, R.A. Bauer, B. Gruening, J. Ismer, E. Michalsky, and R. Preissner. 2009. SuperLooper--a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins. *Nucleic Acids Res.* 37: W571–W574.
35. Johansen, N.T., M.C. Pedersen, L. Porcar, A. Martel, and L. Arleth. 2018. Introducing SEC-SANS for studies of complex self-organized biological systems. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 74: 1178–1191.
36. Kline, S.R. 2006. Reduction and analysis of SANS and USANS data using IGOR Pro. *J. Appl. Crystallogr.* 39: 895–900.
37. Konarev, P.V., V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H.J. Koch, and D.I. Svergun. 2003. PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst.* 36: 1277–1282.
38. Franke, D., and D.I. Svergun. 2009. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 42: 342–346.
39. Semenyuk, A.V., and D.I. Svergun. 1991. GNOM – a program package for small-angle scattering data processing. *J. Appl. Crystallogr.* 24: 537–540.

40. Volkov, V.V., and D.I. Svergun. 2003. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Cryst.* 36: 860–864.
41. Grudin, S., E. Laine, and A. Hoffmann. 2019. Predicting protein functional motions: an old recipe with a new twist. *Bioinformatics.*
42. Seddon, A.M., P. Curnow, and P.J. Booth. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1666: 105–117.
43. Martins de Oliveira, V., V. de Godoi Contessoto, F. Bruno da Silva, D.L. Zago Caetano, S. Jurado de Carvalho, and V.B. Pereira Leite. 2018. Effects of pH and Salt Concentration on Stability of a Protein G Variant Using Coarse-Grained Models. *Biophys. J.* 114: 65–75.
44. Durand, D., C. Vivès, D. Cannella, J. Pérez, E. Pebay-Peyroula, P. Vachette, and F. Fieschi. 2010. NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *J. Struct. Biol.* 169: 45–53.
45. Nitsche, J., I. Josts, J. Heidemann, H.D. Mertens, S. Maric, M. Moulin, M. Haertlein, S. Busch, V.T. Forsyth, D.I. Svergun, C. Uetrecht, and H. Tidow. 2018. Structural basis for activation of plasma-membrane Ca²⁺-ATPase by calmodulin. *Commun. Biol.* 1: 206.
46. Helmcke, I., S. Heumüller, R. Tikkanen, K. Schröder, and R.P. Brandes. 2009. Identification of Structural Elements in Nox1 and Nox4 Controlling Localization and Activity. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 1279–1287.
47. von Lohneysen, K., D. Noack, M.R. Wood, J.S. Friedman, and U.G. Knaus. 2010. Structural Insights into Nox4 and Nox2: Motifs Involved in Function and Cellular Localization. *Mol. Cell. Biol.* 30: 961–975.
48. Jackson, H.M., T. Kawahara, Y. Nisimoto, S.M.E. Smith, and J.D. Lambeth. 2010. Nox4 B-loop creates an interface between the transmembrane and dehydrogenase domains. *J. Biol. Chem.* 285: 10281–10290.
49. Ibrahim, Z., A. Martel, M. Moulin, H.S. Kim, M. Härtlein, B. Franzetti, and F. Gabel. 2017. Time-resolved neutron scattering provides new insight into protein substrate processing by a AAA+ unfoldase. *Sci. Rep.* 7: 40948.

RESULTATS

Caractérisation structurale des
domaines indépendants de SpNox

IV

1

Caractérisation biochimique des domaines isolés de SpNox

1. Introduction sur la production de domaine isolés

A. Intérêt de la production par domaine

Les conclusions de l'étude de SANS réalisée sur SpNox suggèrent une flexibilité significative au niveau de la région charnière entre les domaines transmembranaire (TM) et déshydrogénase (DH) pouvant être à l'origine des difficultés rencontrées pour l'amélioration de la limite de résolution. Une stratégie alternative permettant de faire face à ces obstacles consisterait à scinder SpNox au niveau de la région charnière afin de cristalliser et résoudre indépendamment chacun des domaines TM et DH, en s'affranchissant ainsi d'éventuels mouvements au sein de la protéine pouvant être à l'origine d'une altération de la qualité des contacts cristallins et ainsi contribuer à limiter la diffraction. Cependant, cette approche nécessite préalablement l'identification précise de l'interface entre les deux domaines d'après les informations apportées par les alignements de séquences de protéines homologues de la famille de NOX.

B. Modèle d'homologie

En absence de données structurales à haute résolution et afin de compléter les connaissances fonctionnelles et structurales de SpNox ainsi que d'homologues de NOX, une approche bioinformatique permettant le développement d'un modèle d'homologie de SpNox a été initiée.

Ce travail de construction d'un modèle, bien qu'utilisé dans le chapitre précédent (article en cours de soumission) ne permettait pas d'entrer dans les détails de la constitution de ce modèle dont l'élaboration résulte d'une collaboration étroite avec Susan Smith, co-directrice de cette thèse.

L'utilisation d'une approche impliquant divers outils bioinformatiques complémentaires tels que des serveurs d'alignements multiples de séquences, ainsi que des programmes de prédiction structurale a conduit à l'élaboration d'un modèle théorique, dont l'utilisation pourrait intervenir, en plus de l'approche SANS, dans des études fonctionnelles des interactions entre les domaines transmembranaire et déshydrogénase de la protéine, ainsi que servir de référence lors d'une éventuelle résolution de structure par remplacement moléculaire afin d'accéder à une meilleure compréhension globale du fonctionnement des NOX.

a. Alignements multiples de séquences d'homologues de NOX

La génération d'un modèle structural fiable de SpNox a été initiée avec la création d'un alignement multiple à partir d'un grand nombre de séquences d'homologues eucaryotes et procaryotes des NOX (Fig.4.1.1) et a ainsi permis de repérer des caractéristiques globales communes, telles que la présence de régions hydrophobes correspondants aux hélices du domaine transmembranaire des divers homologues, ou la localisation des résidus histidines impliqués dans la coordination des hèmes essentiels à la réalisation du transfert d'électron à travers la membrane.

De plus, cet alignement a notamment permis la localisation d'une paire de résidus acide base caractéristiques hautement conservés au sein de la région des NOX eucaryotes pouvant correspondre

à la fin du domaine TM de SpNox [1], permettant ainsi de définir le résidu K181¹ comme le début du domaine DH de SpNox.

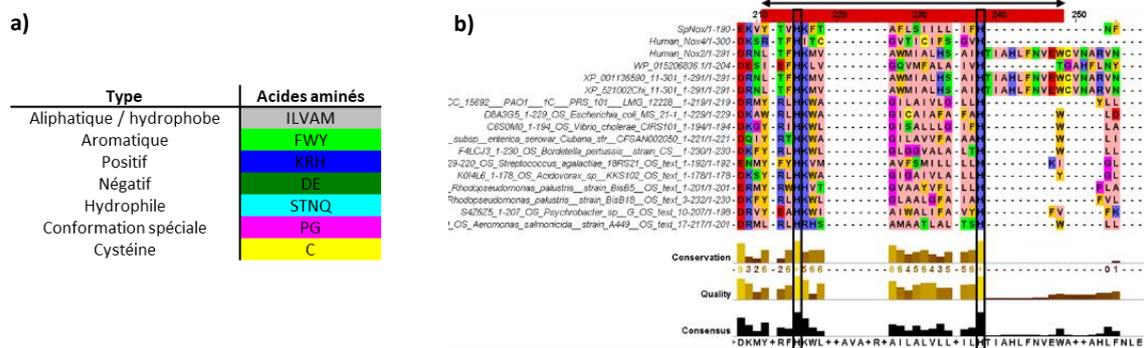


Fig.4.1.1 : Alignement multiple de séquences d'homologues de NOX. (a) Légende associée à l'identification par couleur (Zappo) des propriétés des résidus au sein de l'alignement. (b) Alignement multiple des séquences d'homologues procaryotes et eucaryotes de NOX réalisés dans Jalview [2]. La séquence de SpNox est placée en haut de la liste. La région affichée correspond à la 3^{ème} hélice de SpNox (identifiée par une bande rouge) comportant deux histidines (encadrées en noir) permettant la chélation des hèmes au sein du domaine TM de SpNox.

b. Modèles d'homologies des domaines indépendants de SpNox

A partir des alignements multiples de séquences ainsi obtenus, des séquences consensus ainsi que des modèles d'homologies correspondant respectivement aux domaines DH (Fig.4.1.2.a) et TM (Fig.4.1.2.b) de SpNox ont été générés à l'aide de serveurs bioinformatiques tels que PROMALS3D [3] ou I-TASSER [4].

La solidité des modèles ainsi obtenus a été vérifiée par une approche bioinformatique à travers l'alignement structural des modèles de domaines TM et DH de SpNox avec les domaines respectifs issus de la structure de CsNox, résolue récemment [5]. La superposition des structures met en évidence un accord global relativement bon du modèle avec CsNox (Fig.4.1.2.c), avec la plupart des motifs de repliements partageant des similitudes concernant l'arrangement ou la taille. En revanche, des divergences mineures peuvent être observées, notamment au niveau des boucles du modèle de SpNox, dont la longueur est inférieure à celles de CsNox (Fig.4.1.2.d). Les principales différences sont notamment observées au niveau des boucles supérieures A et C (Fig.4.1.2.d) qui traduisent un rôle fonctionnel spécifique de CsNox lié à la régulation par les ions calcium.

Les résultats préliminaires ont conduit à un modèle de TM dont la boucle D, connectant les hélices 4 et 5, est orientée en direction du cœur de la protéine (Fig.4.1.2.e). Or, en accord avec son rôle essentiel dans le transfert d'électron entre les domaines TM et DH [6], suggéré par des données antérieures sur les isoformes eucaryote [7, 6], cette conformation de la boucle D ne semble pas favorable à l'interaction avec le domaine déshydrogénase et il semblerait ainsi plus vraisemblable que celle-ci soit dirigée vers le solvant, de manière similaire à l'orientation observée dans la structure de CsNox.

Celle-ci a ainsi été remodelisée en utilisant un outil (SuperLooper [8]) permettant la recherche, parmi une banque de donnée répertoriant un grand nombre de boucles existantes au sein de diverses protéines, de substitués potentiels de cette boucle. L'alignement Promalls-3D a été utilisé afin d'identifier les ancrs membranaires N-ter et C-ter ainsi que la séquence exacte de la boucle D, chacune requise par l'outil de reconstruction.

¹ Ainsi, dans le manuscrit, le domaine déshydrogénase de SpNox issu de la construction SpNox peut indifféremment être désigné par « DH » ou « SpNOX_{DH} ».

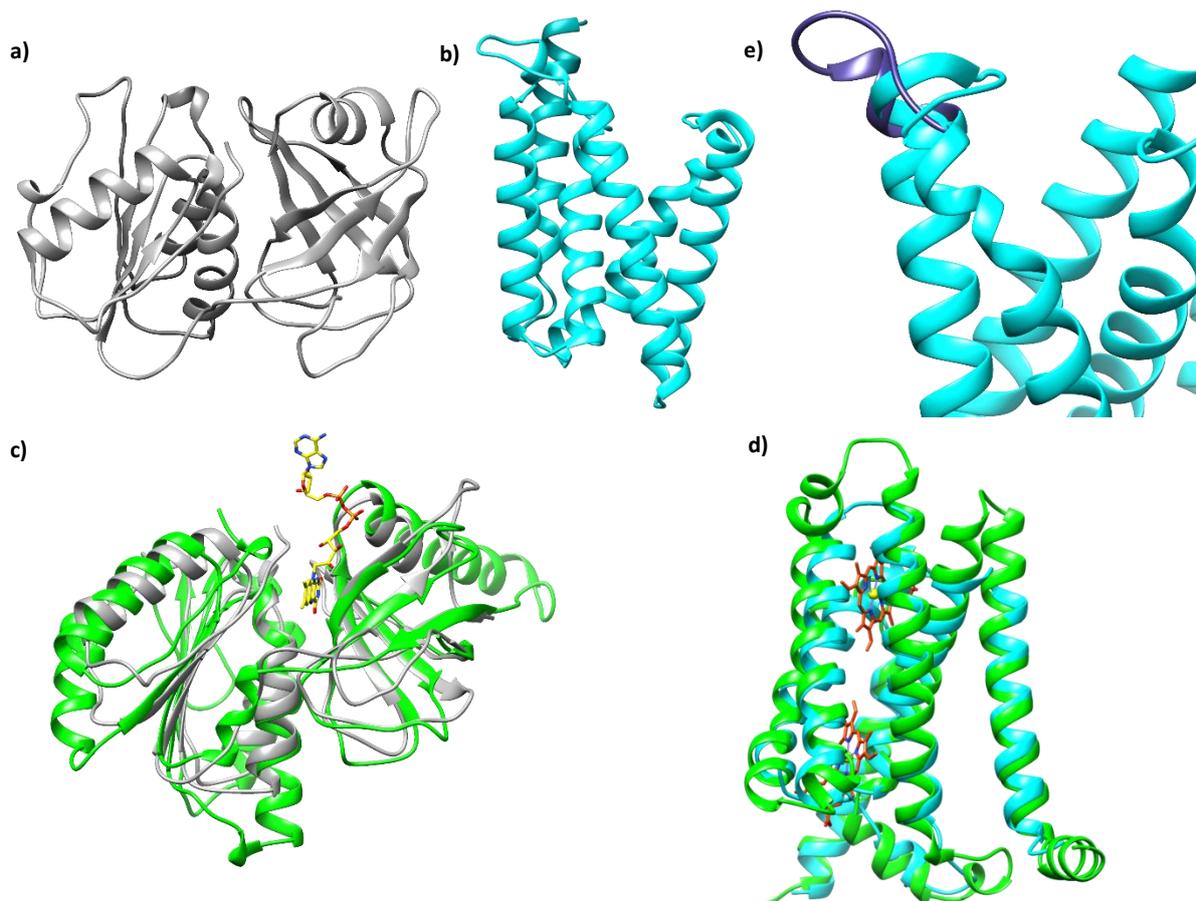


Fig.4.1.2 *Modèle d'homologie de SpNox et comparaison structurale à un homologue de NOX* (a) Modèle d'homologie du domaine DH de SpNox. (b) Modèle d'homologie du domaine TM de SpNox (c) Superposition du modèle d'homologie (gris) et de la structure de CsNox (vert) (5O0x). (d) Superposition du modèle d'homologie du TM (cyan) et de la structure de CsNox (vert) (5O0t) Le FAD (jaune) et les hèmes (rouge) proviennent d'un alignement structural avec la structure de CsNox. (e) La boucle D initiale (bleu cyan) orientée vers l'intérieur du TM est comparée à la boucle remodelisée (SuperLooper) pointant vers l'extérieur (bleu foncé). Le modèle d'homologie a été créé avec I-TASSER.

Cette approche a conduit à la sélection et l'intégration d'une nouvelle boucle D dans le modèle du domaine TM de SpNox dont l'orientation est en accord avec les interactions supposées intervenir entre les domaines de la protéine (Fig.4.1.2.e).

c. Modèle d'homologie de SpNox sous forme entière

Afin de reconstituer un modèle d'homologie de la protéine SpNox sous forme entière, les domaines TM et DH de SpNox ont été ancrés ensemble à travers l'alignement respectif de ceux-ci avec CsNox, dont le modèle résulte de l'ancrage entre les structures de ses domaines TM et DH (Fig.4.1.3).

Le modèle ainsi créé, suffisamment satisfaisant en absence de structure haute résolution pour son utilisation au sein de l'étude SANS pourrait également être utilisé dans une stratégie impliquant des approches de remplacement moléculaire pour résoudre le problème des phases lors de la résolution éventuelle de structure [9]. De plus, ce modèle pourrait fournir une bonne compréhension des interactions soit entre les deux domaines soit entre un domaine et les coenzymes.

En revanche, la présence d'incompatibilités structurales au niveau de l'interface entre les deux domaines (Fig.4.1.3) démontre qu'une telle architecture n'est pas totalement significative physiologiquement, suggérant la perfectibilité du modèle, et que des ajustements devraient être réalisés pour obtenir un ancrage plus représentatif de la réalité. En l'attente de la résolution de la structure de la protéine sous forme entière, complexifiée par la présence de larges zones hydrophobes

dans le TM ainsi que la probable flexibilité entre les domaines, une approche alternative, consistant à tenter de produire et cristalliser la protéine par domaines, a ainsi été envisagée.

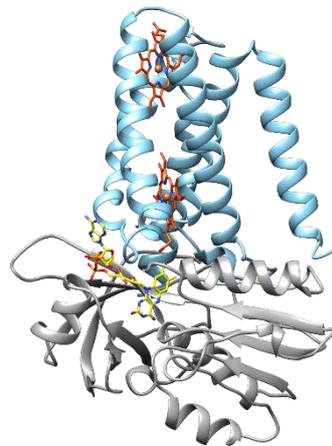


Fig.4.1.3 : Modèle d'homologie de SpNox sous forme entière par ancrage des modèles TM et DH. Les domaines DH (gris) et TM (bleu), modélisés indépendamment ont été ancrés sur la base d'alignements structuraux avec la structure de CsNox reconstituée sous forme entière et fournie par Dr.Magnani. Le modèle inclut les hèmes chélatés entre les hélices 3 et 5 ainsi que le FAD lié au niveau du domaine DH, également extraits et positionnés d'après la structure de CsNox.

2. Production des domaines TM et DH de SpNox

A. Expression

D'après ces observations, deux constructions (Fig.4.1.4) correspondant respectivement aux domaines transmembranaires dont la séquence est définie par les 180 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de SpNox (SpNox_{TM}), ou à l'extrémité C-ter de la protéine à partir du résidu K181 (SpNox_{DH}), ont été conçues afin de permettre la caractérisation indépendante des domaines respectifs de SpNox lors d'étude structurale.

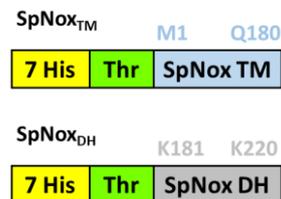


Fig.4.1.4 : Schéma des constructions réalisées pour la caractérisation fonctionnelle et structurale indépendante des domaines TM et DH de SpNox. L'étiquette polyhistidine permet la purification sur chromatographie d'affinité. Le site Thr correspond au site de clivage à la thrombine. Le domaine TM, correspondant à la construction SpNox_{TM} (haut) est composé des résidus M1 à Q180 N-ter de SpNox et le DH (bas) définissant la construction SpNox_{DH} correspond aux résidus K181 à S400 de SpNox.

B. Caractérisation spectrale

Afin de vérifier le repliement correct de l'extrémité transmembranaire de SpNox et d'évaluer la présence d'hèmes coordonnés au sein du domaine isolé, un spectre différentiel a été réalisé sur les membranes exprimant la protéine tronquée (SpNox_{TM}) (Fig.4.1.5). La signature spectrale, composée des deux pics à 558nm et 426nm caractéristiques des hèmes, observée sur le spectre différentiel des membranes du domaine TM, indique que la production de SpNox sous forme tronquée ne semble pas affecter les propriétés de la protéine à lier les groupements héminiques suggérant ainsi que l'intégrité structurale du domaine a été préservée.

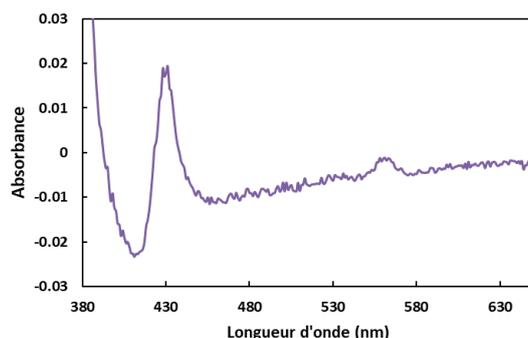


Fig.4.1.5 : Spectre différentiel mesuré sur des membranes exprimant SpNox_{TM}. Le spectre réduit a été mesuré après réduction des protéines membranaires (0.1mg/ml) par ajout de dithionite de sodium dans l'échantillon protéique. La présence des pics à 426 et 556nm indique la présence d'hèmes au sein des membranes suggérant que le TM est correctement replié au sein des membranes.

C. Purification

Le chromatogramme respectif des domaines isolés de SpNox (4.1.6.a & b) présente un profil d'éluion dont l'allure du pic principal, relativement peu étalée, révèle que les constructions SpNox_{TM} (TM) et SpNox_{DH} (DH) sont principalement purifiées sous forme monomérique en solution. Cependant, la présence d'un léger épaulement au sein du pic principal du domaine TM témoigne de l'existence d'une faible quantité de protéines éluées sous forme oligomérique. Enfin, la présence d'agrégats peut être constatée au sein de l'échantillon purifié avec une large bande en amont du pic d'éluion de la protéine. La déconvolution du chromatogramme permet de distinguer les différentes espèces coexistant en solution afin de procéder à la sélection des fractions homogènes contenant uniquement la forme monomérique du TM non contaminée par les fractions de l'épaulement ou les agrégats. A l'inverse, le chromatogramme du domaine DH témoigne de la présence de très peu d'agrégats ou de forme oligomérique.

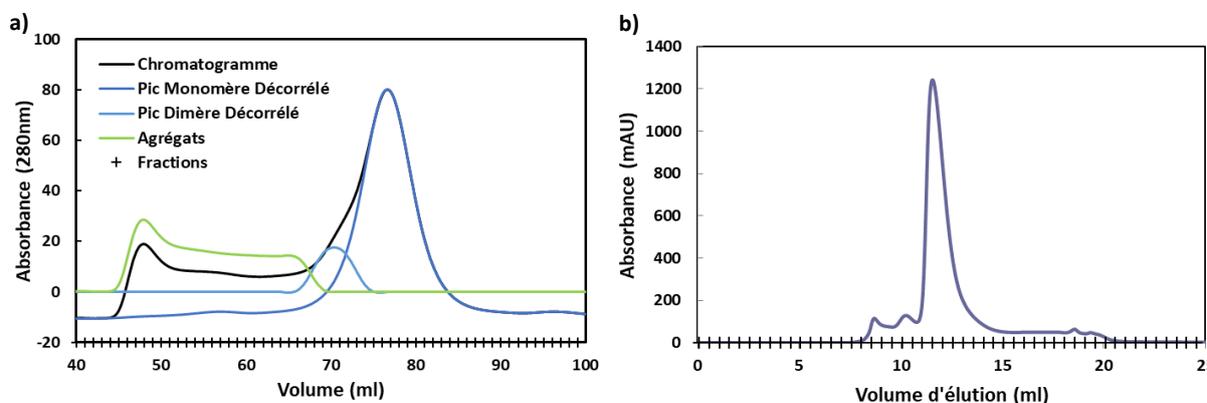


Fig.4.1.6 : Purifications indépendantes des domaines TM et DH de SpNox par chromatographie d'exclusion de taille. (a) Le chromatogramme de SpNox_{TM} (noir) est obtenu par mesure d'absorbance à 280nm en sortie de chromatographie d'exclusion de taille. L'épaulement du chromatogramme du domaine TM (cyan) est décorrélé du pic principal (bleu foncé) afin de permettre la sélection et la caractérisation indépendante des fractions issues de ces deux pics, en permettant d'identifier et d'exclure les fractions contenant un mélange d'espèces. La décorrélation correspondant aux agrégats est représentée en vert. (b) Le chromatogramme de SpNox_{DH} (bleu foncé) est obtenu par mesure d'absorbance à 280nm en sortie de chromatographie d'exclusion de taille. Les fractions du pic principal sont regroupées en excluant les agrégats.

a. Caractérisation des purifications sur gels Acrylamide

L'efficacité de la purification a été évaluée par migration sur gel 15% afin de caractériser la pureté des domaines TM et DH et de permettre la vérification de la taille des domaines isolés de SpNox (Fig.4.1.7). Celle-ci révèle l'absence de contaminants majeurs après purification des différentes constructions de SpNox. La présence de bandes intenses dans les échantillons de TM et DH respectivement observée à 22 et 27kDa témoigne d'une taille quasiment réduite de moitié par rapport à SpNox_{FL} (48kDa) et

montre que le TM est légèrement plus court que le DH en accord avec les séquences des deux domaines représentant approximativement la moitié de la protéine, avec le K correspondant au 181^{ème} sur les 400 résidus de SpNox.

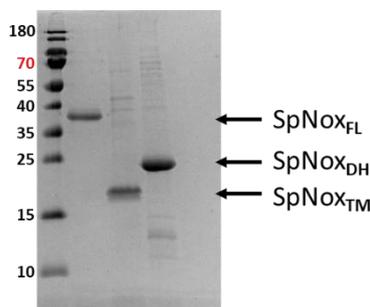


Fig.4.1.7 : Caractérisation des purifications indépendantes des domaines TM et DH de SpNox par chromatographie d'exclusion de taille sur gel d'acrylamide 15% (SDS-PAGE). Les fractions sélectionnées à l'issue des purifications indépendantes de la protéine sous forme entière $SpNox_{FL}$, ou des versions tronquées $SpNox_{TM}$ et $SpNox_{DH}$ par chromatographie d'exclusion de taille ont été regroupées et la pureté et l'homogénéité sont caractérisées par migration sur gel d'acrylamide 15% (SDS-PAGE) coloré au bleu de Coomassie. La présence de la protéine sous forme entière ($SpNox_{FL}$) ou des domaines indépendants ($SpNox_{TM}$, $SpNox_{DH}$) est indiquée par des flèches.

b. Caractérisation de l'intégrité des domaines

L'enregistrement d'un spectre d'absorbance sur le domaine TM purifié (Fig.4.1.8) permet de quantifier le nombre d'hèmes chélatés par la protéine tronquée grâce au calcul du ratio des absorbances mesurées à 414nm et 280nm, dont la valeur, égale à 1.91, montre que le TM de SpNox contient, de manière similaire à la protéine entière, deux groupements héminiques fixés par les hélices transmembranaires, suggérant ainsi que l'intégrité structurale du domaine semble préservée au sein de la forme tronquée. Le ratio A_{414nm}/A_{280nm} , proche de la valeur théorique de 2, atteste de la présence d'un contenu héminique (A_{414nm}) environ deux fois supérieur² à la quantité de protéines totales (A_{280nm}) confirmant que la majorité des protéines purifiées contiennent des hèmes, et témoigne également de la pureté de l'échantillon préalablement constatée lors de la migration sur gel.

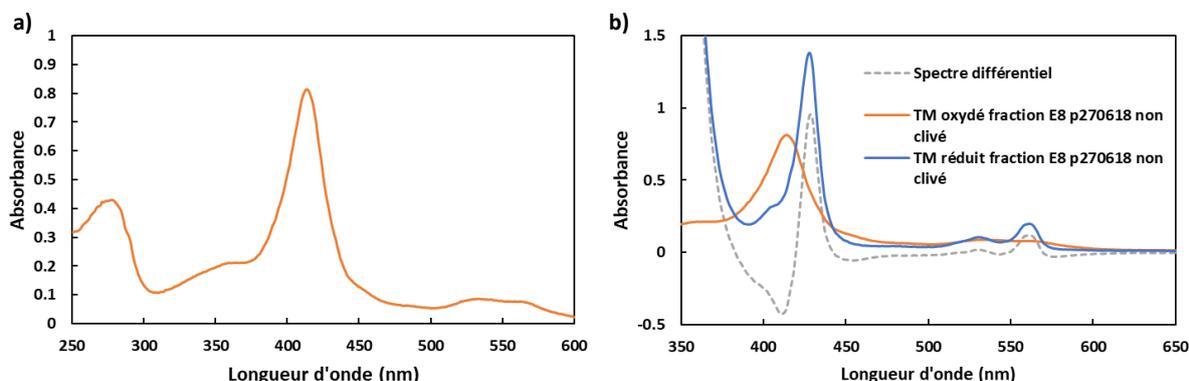


Fig.4.1.8 : Spectre d'absorbance et spectre différentiel mesuré sur $SpNox_{TM}$ purifié. (a) Le spectre du domaine TM, purifié indépendamment du domaine DH, a été enregistré entre 240 et 800nm afin de déterminer la concentration de l'échantillon ainsi que d'évaluer le contenu en hèmes. (b) Le spectre réduit (orange) a été mesuré après réduction de la protéine par ajout de dithionite de sodium à l'échantillon protéique. Les pics à 426 et 556nm indiquent la présence d'hèmes au sein des membranes suggérant que le TM est correctement exprimé dans les membranes. Le spectre différentiel est tracé en pointillé.

Des spectres ont également été réalisés entre 240 et 800nm sur le domaine DH de SpNox WT ainsi que sur les domaines DH des mutants F397W et F397S qui ont été préparé en parallèle pour les essais de

² Les epsilons molaires de la protéine à 280nm et de SpNox contenant les hèmes à 414nm étant relativement similaires, le ratio des absorbances A_{414nm}/A_{280nm} est équivalent au ratio des concentrations, égal à 2 dans le cas de la présence de deux hèmes au sein de la protéine.

cristallogénèse afin de quantifier la concentration de ces protéines en sortie de purification (Fig.4.1.9). Les pics d'absorbance de ces trois spectres montrent ainsi que les protéines sont purifiées avec la même concentration finale proche de 2.8mg/ml. En revanche le spectre de SpNox_{DH} F397W présente deux pics d'absorbance à 370nm et 450nm additionnels, absents pour les autres protéines qui semble témoigner de la présence de FAD au sein du mutant, comme le confirme le spectre réalisé sur le FAD seul superposé à ces courbes (Fig.4.1.9). Alors que la purification du DH est réalisé en absence de FAD, les pics additionnels à 370 et 450nm observés pour le mutant F397W similaires aux spectres mesurés en présence de FAD seul semble indiquer que ce mutant, capable de conserver à travers le processus de purification le FAD lié lors de l'étape d'expression, présente une affinité supérieure pour le FAD à la forme WT ou F397S, qui lient respectivement le FAD en quantité sous stœchiométrique suggérant que le FAD semble moins stabilisé au sein de ces constructions.

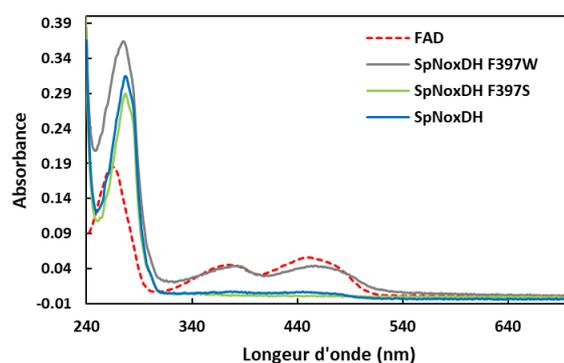


Fig.4.1.9 : Spectre d'absorbance entre 240 et 800nm réalisé sur SpNox_{DH} WT, F397W et F397S ainsi que sur du FAD (5µM). Les pics à 280nm des spectres de protéines permettent d'évaluer la concentration de protéines obtenue après purification. Les pics à 370 et 450nm observés pour SpNoxDH F397 et similaires au spectre mesuré en présence de FAD (spectre pointillé) seul témoignent de la présence du cofacteur au sein du mutant malgré l'absence du FAD durant la purification du DH. SpNox DH correspond au domaine déshydrogénase de la protéine WT.

L'intégrité du domaine DH a ensuite été évaluée en mesurant l'activité diaphorase, correspondant au transfert d'électrons du NADPH vers le centre redox du FAD cytosolique. Les courbes d'activité montrent que le domaine DH est capable de lier le substrat NADPH ainsi que son cofacteur afin d'assurer l'activité diaphorase (Fig.4.1.10.a). Afin de comparer les propriétés de liaison aux coenzymes du domaine DH seul par rapport à la protéine entière, des mesures d'affinité pour le substrat et le cofacteur ont été réalisées à l'aide respectivement d'une gamme de concentration de NADPH ou de FAD (Fig.4.1.10.b).

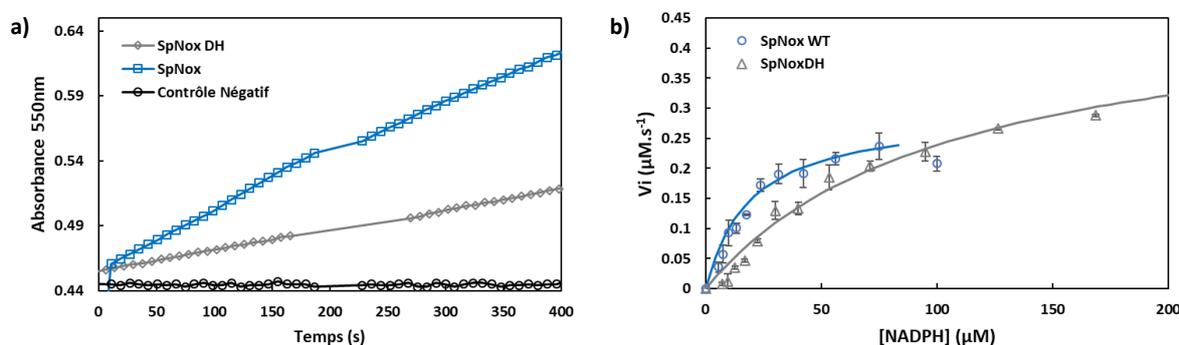


Fig.4.1.10 : Caractérisation de l'activité cytochrome c réductase et de l'affinité de SpNox_{FL} ou SpNox_{DH} pour le NADPH. (a) Suivi de l'activité cytochrome C réductase de SpNox_{DH} au cours du temps par mesure d'absorbance à 550nm témoignant de la réduction du cytochrome c. Domaine DH (bleu) SpNox_{FL} WT (gris) ou milieu réactionnel en absence de protéine (noir). (b) Courbes de cinétique enzymatique de SpNox_{FL} WT et SpNox_{DH} obtenues sur une gamme de concentrations croissantes de NADPH. SpNox_{FL} WT (bleu) domaine DH (gris). Représentation de Michaelis et Menten.

Les courbes obtenues en fonction de concentrations croissantes de NADPH montrent que le domaine DH sous forme isolé présente une affinité pour le substrat légèrement inférieure à SpNox_{FL}, avec des valeurs de K_m respectivement égales à 105.3 μ M et 23.8 μ M (Tab.4.1.1.a), suggérant que la présence du domaine TM semble contribuer dans la protéine entière à établir une meilleure affinité, suggérant ainsi l'existence d'une coopérativité entre les domaines lors de la liaison du substrat au sein du DH.

NADPH	K_m (μ M)	V_m (μ M.s ⁻¹)	FAD	K_m (μ M)	V_m (μ M.s ⁻¹)
SpNox _{FL} WT	23.8 \pm 0.9	0.26 \pm 0.02	SpNox _{FL} WT	0.049 +/- 0.09	0.15 \pm 0.09
SpNox _{DH} WT	105.3 \pm 2.7	0.49 \pm 0.07	SpNox _{DH} WT	13.89 +/- 0.3	0.3 \pm 0.09

Tab.4.1.1 : Paramètres cinétiques apparents de la réduction du cytochrome c par SpNox_{FL} et SpNox_{DH} en présence de gammes croissantes de NADPH ou FAD. (a) Constantes apparentes d'affinité (K_m) et de vitesse maximale (V_m) pour le substrat NADPH, en présence d'une concentration de cofacteur FAD fixée à 10 μ M. (b) Constantes apparentes d'affinité (K_m) et de vitesse maximale (V_m) pour le cofacteur FAD, en présence d'une concentration de donneur d'électron NADPH fixée à 200 μ M.

Le DH semble présenter une vitesse maximale (V_m) supérieure à la protéine entière témoignant d'une meilleure efficacité catalytique, cependant, la comparaison étant réalisée entre l'activité oxydase de SpNox_{FL}, résultant de l'ensemble du transfert d'électron à l'échelle des deux domaines composant la protéine, et l'activité diaphorase du DH uniquement, une perte d'efficacité catalytique lors du transfert d'électron entre les hèmes du TM pourrait être à l'origine de cette différence de V_m entre les deux protéines.

Une gamme de concentration en FAD a également été réalisée (Fig.4.1.11.a) afin d'évaluer et comparer l'affinité du domaine DH pour le cofacteur FAD avec l'affinité de SpNox sous forme entière mesurée lors de tests d'activité cytochrome c réductase. Les paramètres extraits des courbes de cinétique enzymatique (Fig.4.1.11.b) obtenues sur les deux versions de la protéine indiquent une perte d'affinité selon un facteur 300 du DH pour le FAD par rapport à la protéine entière, pouvant témoigner d'un mauvais repliement du domaine DH ou de l'existence d'interactions supplémentaires apportées par le domaine transmembranaire de SpNox pour stabiliser le FAD et ainsi améliorer son affinité.

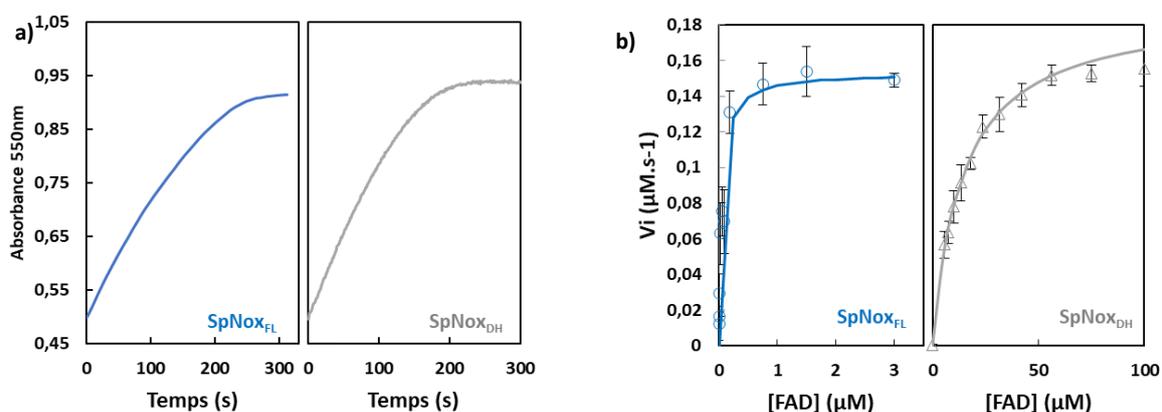


Fig.4.1.11 : Caractérisation de l'activité cytochrome c réductase et de l'affinité de SpNox_{FL} ou SpNox_{DH} pour le FAD. (a) Suivi de l'activité cytochrome C réductase de SpNox_{FL} par mesure d'absorbance à 550nm. SpNox WT (bleu) domaine DH (gris). (b) Courbes de cinétique enzymatique de SpNox_{FL} (bleu) et SpNox_{DH} (gris) obtenues sur une gamme de concentrations croissantes de FAD. SpNox_{FL} (bleu) domaine DH (gris). Les courbes en trait plein correspondent aux ajustements obtenus à partir des paramètres K_m et V_m extraits avec Prism.

c. Vérification du repliement du domaine DH

L'état de repliement du domaine DH de SpNox a été évalué à l'aide de mesure RMN 1D afin de vérifier si la perte d'affinité du domaine DH pour le FAD par rapport à SpNox_{FL} pouvait provenir d'une perte de repliement de la protéine. Les expériences RMN permettent l'observation des couplages scalaires et dipolaires entre spins. L'observation du transfert d'aimantation, par couplage dipolaire, produit des

effets Overhauser nucléaires (NOE) entre les noyaux situés à moins de 5Å l'un de l'autre, et permet l'estimation des distances entre les noyaux observés [10].

Lors des expériences de RMN 1D, les effets de diffusion NOE entre protons ^1H - ^1H sont mesurés lors de l'application d'impulsions de champ magnétique excitant spécifiquement les protons aliphatiques de la protéine en solution. Les valeurs de λ_{NOE} renseignent sur les paramètres intrinsèques du réseau local de protons tels que le nombre, la densité et la mobilité des protons et sont ainsi particulièrement dépendantes de l'état de repliement des protéines [11]. En effet, les atomes d'hydrogène au sein d'une protéine globulaire correctement repliée constitue un réseau compact permettant une diffusion de spin inter protons très efficace conduisant à une valeur de λ_{NOE} très inférieure à 1 (Fig.4.1.12.a). A l'inverse, une chaîne peptidique allongée, correspondant à une perte de repliement de la protéine est caractérisée par une faible densité locale de protons n'autorisant pas une diffusion de spin optimale et conduit ainsi à une valeur de λ_{NOE} proche de 1 (Fig.4.1.12.b). En ne reposant que sur la caractérisation des interactions entre proton ^1H , cette technique présente l'avantage de s'affranchir de la nécessité d'étapes de marquages isotopiques.

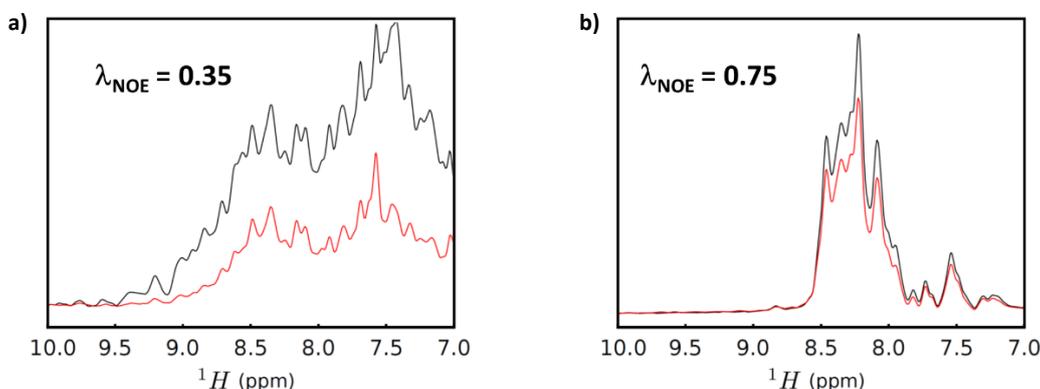


Fig.4.1.12 : Caractérisation du repliement des protéines par RMN 1D. Superposition des spectres 1D de référence (noirs) et à saturation (rouge) obtenus dans le cas d'une protéine correctement repliée (a) ou dépliée (b).

La mesure du λ_{NOE} sur la construction SpNox_{DH} à une valeur de 0.37 (Fig.4.1.13), témoigne d'une haute densité de protons correspondant à une protéine relativement bien repliée avec une faible proportion de motifs flexibles [11].

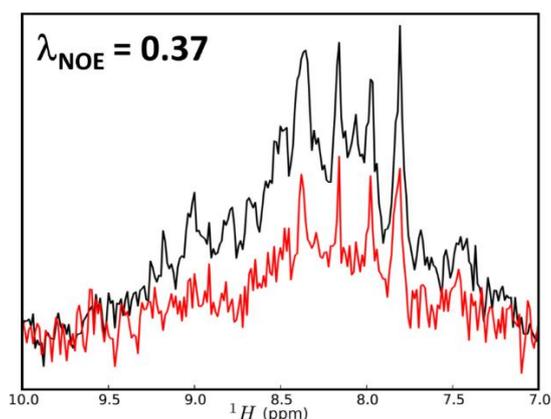


Fig.4.1.13 : Spectre RMN 1D HET-SOFAST mesuré sur le domaine DH de SpNox. Le calcul des interactions NOE conduit à une valeur de λ_{NOE} de 0.37 proche de la valeur de référence de 0.35 associée à une protéine bien repliée.

3. Thermostabilité des domaines DH et TM isolés

En amont des essais de cristallogénèse, la thermostabilité des domaines isolés de SpNox, respectivement SpNox_{TM} et SpNox_{DH}, a été évaluée indépendamment à l'aide de mesures nanoDSF.

A. Optimisation des concentrations des domaines isolés pour le nanoDSF

Par analogie avec la mise au point des conditions expérimentales réalisée avec la protéine entière, la détermination de la concentration optimale nécessaire à une évaluation fiable de la température de fusion (T_m) de chacun des domaines isolés de SpNox a été réalisée (Fig.4.1.14).

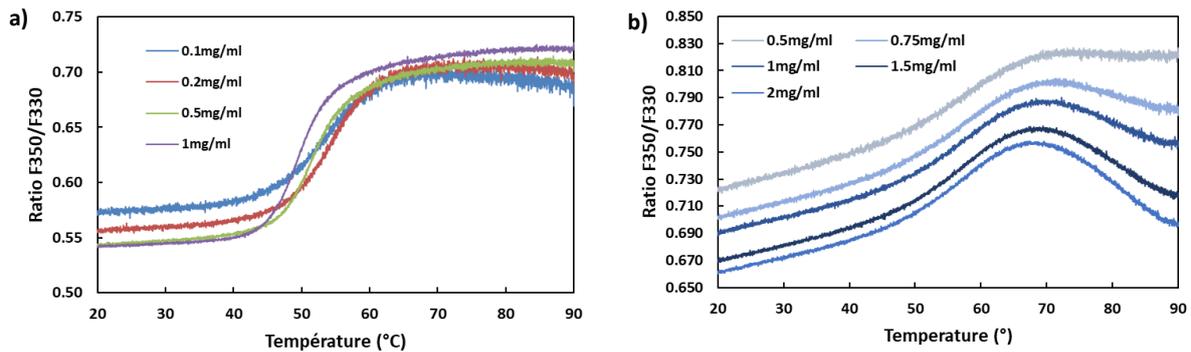


Fig.4.1.14 : Détermination de la concentration optimale des domaines isolés (TM ou DH) de SpNox pour l'évaluation du T_m par nanoDSF (a) Profils de dénaturation obtenus sur SpNox_{DH} en fonction de la concentration de protéine. (b) Profils de dénaturation obtenus sur SpNox_{TM} en fonction de la concentration de protéine.

Les profils de dénaturation mesurés sur le domaine DH (SpNox_{DH}) de SpNox pour des concentrations entre 0.1 et 1 mg/ml (Fig.4.1.14.a), présentent peu de dépendance à la concentration de protéine, avec une variation de T_m maximale constatée de 4°C entre 0.1 et 1 mg/ml. Ainsi, une concentration de 1 mg/ml a été défini comme standard pour la réalisation d'expériences de thermostabilité ultérieures.

En revanche, les profils obtenus sur le domaine TM de SpNox (Fig.4.1.14.b) présentent une allure dont la forme en cloche est accentuée par l'augmentation de la concentration en protéine et montrent notamment l'existence, à partir de 1 mg/ml (~50 μM), d'une forte agrégation du domaine lors de l'augmentation de la température. L'effet d'agrégation accentué avec la concentration en protéine, bien que déjà constaté avec la protéine sous forme entière, apparaît amplifié au sein de la construction tronquée SpNox_{TM}, suggérant ainsi que parmi les deux domaines présents au sein de SpNox, le domaine TM pourrait être le responsable de la forme en cloche observée sur les profils de dénaturation de la protéine sous forme entière.

De plus, au niveau des basses températures, les profils de dénaturation acquis sur le domaine TM de SpNox semblent nettement plus diffus que pour la protéine entière, avec une augmentation progressive du ratio F350/F330 en amont de la transition caractéristique du T_m , témoignant ainsi d'une dénaturation progressive du domaine TM apparaissant très tôt dans l'expérience et pouvant être expliquée par l'importante agrégation préalablement constatée.

Ainsi, de manière similaire à SpNox WT, les profils de dénaturation mesurés sur une gamme de concentration 0.5 mg/ml et 2 mg/ml ont montré que les concentrations en protéine les plus faibles étaient plus favorables, et ont ainsi permis de définir la concentration optimale de TM (0.5 mg/ml) permettant de limiter l'agrégation afin d'accéder à une détermination fiable de la thermostabilité de la protéine par nanoDSF.

B. Optimisation de la thermostabilité des domaines isolés de SpNox

a. Comparaison aux profils de thermostabilité de SpNox WT

Les courbes de dénaturation obtenues pour les constructions tronquées de SpNox, respectivement TM et DH, dans les conditions expérimentales définies comme optimales pour la mesure révèlent que les profils obtenus avec chacun des domaines indépendants TM et DH de SpNox présentent des allures très différentes du profil de dénaturation associé à la protéine sous forme entière SpNox_{FL} (Fig.4.1.15). En effet, le signal du ratio de fluorescence du domaine DH (SpNox_{DH}) présente, par rapport au signal de la protéine entière, une transition entre 45 et 50°C plus abrupte, caractérisée par une température de fusion (T_m) de 47°C, ainsi qu'une amplitude double de celle de SpNox.

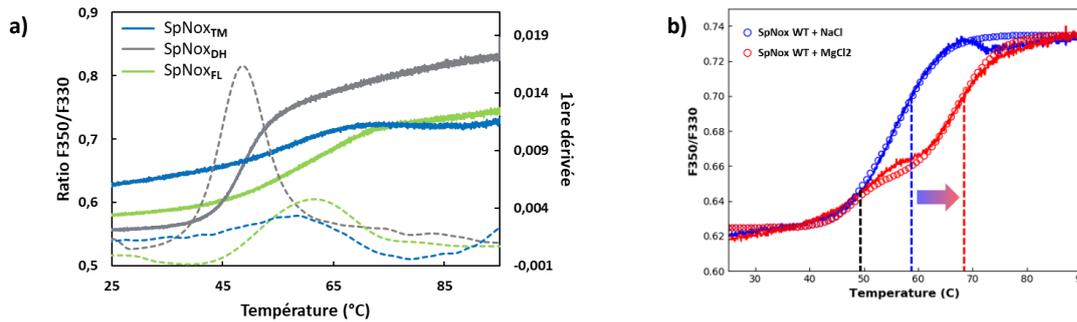


Fig.4.1.15 : Profils de dénaturation mesurés par nano-DSF sur les domaines isolés de SpNox. (a) La thermostabilité des domaines DH et TM de SpNox ont été mesurées par suivi nanoDSF des ratios de fluorescence F350/F330 (traits pleins) et des 1^{ère} dérivées (pointillés) dans les conditions expérimentales préalablement déterminées comme optimales pour la mesure de thermostabilité de SpNox_{FL} (1mg/ml), SpNox_{DH} (1mg/ml) et SpNox_{TM} (0.5mg/ml). (b) Rappel des ajustements réalisés sur la protéine SpNox_{FL} en présence de NaCl ou MgCl₂ à l'aide d'un modèle à deux domaines permettant d'extraire dans le cas du NaCl un 1^{er} T_m à 48.7° et un 2nd T_m à 57°C. Les pointillés noirs indiquent le T_m supposé indépendant du MgCl₂, les bleus indiquent le T_m de la seconde transition en présence de NaCl seul et les rouges indiquent le T_m stabilisé par le MgCl₂. La flèche indique la stabilisation du second T_m en présence MgCl₂.

La courbe nanoDSF du TM mesurée dans un tampon identique à celui utilisé pour la chromatographie d'exclusion de taille ainsi que pour les tests réalisés avec la protéine entière, révèle quant à elle une faible amplitude avec une transition progressive relativement tardive permettant d'extraire un T_m de 59°.

Les valeurs de températures de dénaturation mesurées pour les deux domaines isolés de SpNox semblent proches de celles extraites préalablement par ajustement, en considérant deux domaines indépendants, des courbes de ratio de fluorescence mesurées sur SpNox_{FL} (chapitre 3.1 et Fig.4.1.15.b), semblant ainsi confirmer que la transition unique observée pour la protéine entière résulterait en réalité du recouvrement des dénaturations indépendantes successives des deux domaines composant la protéine (Tab.4.1.2).

	Domaine DH	Domaine TM
Mesures nanoDSF sur domaines isolés	47°	59°
Ajustement du profil de SpNox WT à l'aide d'un modèle à 2 dénaturations	48.7	57°

Tab.4.1.2 : Valeurs des T_m obtenues expérimentalement sur chacun des domaines TM et DH de SpNox purifiés indépendamment ou par ajustement du profil de dénaturation de SpNox WT à l'aide d'un modèle à deux dénaturations.

Ainsi, grâce à la comparaison des valeurs de T_m déterminées expérimentalement sur chacun des domaines isolés de SpNox avec les valeurs extraites de l'ajustement réalisé sur le profil de la protéine sous forme entière (Chapitre 3.1), l'expression et la production indépendante des domaines TM et DH de SpNox semble ainsi désormais permettre une attribution expérimentale de la contribution de

chacun des domaines TM et DH au sein de la transition globale mesurée sur la protéine sous forme entière (Tab.4.1.2).

Enfin la comparaison des courbes de dénaturation du DH isolé avec les courbes de thermoFAD montre un écart des températures de fusion de seulement 2°C pouvant indiquer que la mesure de stabilité réalisée par thermoFAD sur la protéine entière permet de caractériser la dénaturation du domaine DH, également visible sur les ratios différentiels obtenus en présence et en absence de FAD.

b. Optimisation de la concentration de $MgCl_2$

L'étude de la stabilité de SpNox sous forme entière en présence de $MgCl_2$ a mis en évidence que la présence du sel chaotrope semblait permettre la stabilisation d'un seul des domaines au sein de la protéine entière (Chapitre 3.1 et Fig.4.1.15.b).

Afin de tenter d'interpréter et de comprendre l'effet de ce sel, et ainsi pouvoir attribuer la stabilisation résultante de la présence de celui-ci à l'un ou l'autre des domaines de SpNox, notamment dans le but d'exploiter cette augmentation de stabilité lors de cristallisation indépendante des domaines TM et DH, la thermostabilité de chacun des domaines de SpNox a été évaluée en présence de $MgCl_2$ (Fig.4.1.16).

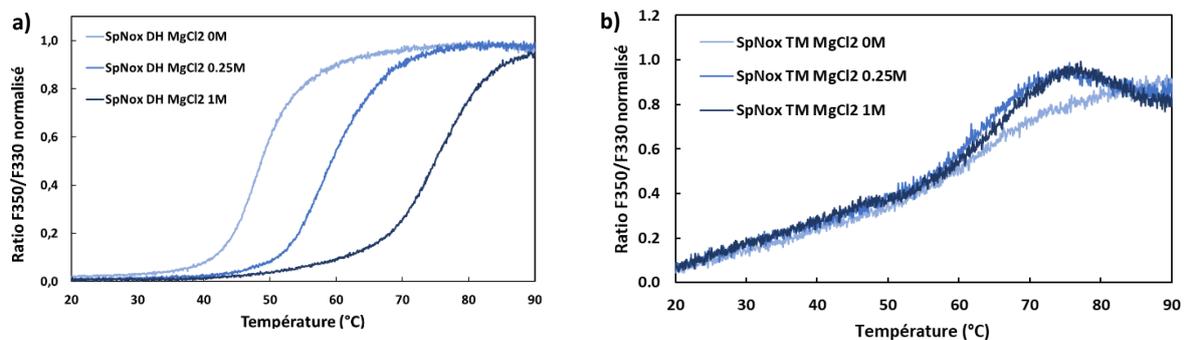


Fig.4.1.16 : Etude de la thermostabilité des domaines isolés en présence de $MgCl_2$. Impact de la concentration en $MgCl_2$ sur le domaine DH (a) ou TM (b). En raison des tests de cristallisation LCP menés sur le domaine, celui-ci est purifié en HEPES, contrairement aux tests précédents réalisés en Tris. Ce changement de tampon conduit à une augmentation du T_m extrait pour $SpNox_{TM}$

Pour des concentrations croissantes en $MgCl_2$, une nette augmentation du T_m est observée sur le domaine déshydrogénase, avec un T_m s'élevant à 47°C en absence de $MgCl_2$ et atteignant 75°C en présence de 1M $MgCl_2$ (Fig.4.1.16.a). Contrairement à la stabilisation observée sur le domaine DH, l'effet sur le domaine transmembranaire de SpNox semble négligeable, avec un T_m de 67°C indépendamment de la concentration en $MgCl_2$ (Fig.4.1.16.b). L'augmentation globale du T_m est liée à aux contraintes de cristallogénèse (HEPES) qui ont imposés l'utilisation d'un tampon distinct de celui précédemment utilisé pour la gamme de concentration (Tris). Ainsi, ce résultat suggère que la supplémentation en $MgCl_2$ pourrait, à travers la stabilisation du domaine déshydrogénase, permettre d'améliorer la stabilité de SpNox, et pourrait également notamment constituer un candidat intéressant à tester, en tant qu'additif ou dans le tampon de purification, pour favoriser la cristallogénèse de $SpNox_{DH}$.

Les ajustements des profils de dénaturation de SpNox WT en présence ou en absence de $MgCl_2$ (Chapitre 3.1 – Fig.4.1.15.b) avaient évalué le T_m du domaine non impacté par ce sel à 48,7°C et une stabilisation du second domaine de 11°C en présence de $MgCl_2$, s'élevant alors de 57°C à 68°C.

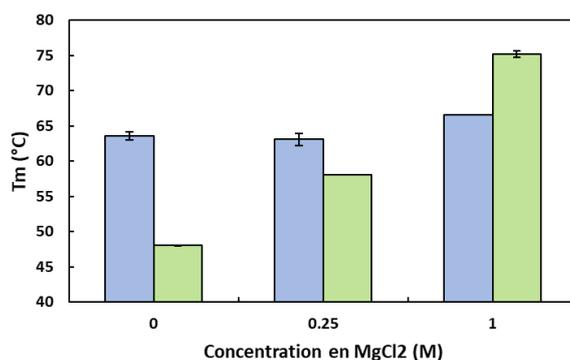


Fig.4.1.17 : Evolution du T_m sur les domaines isolés de SpNox en fonction de la concentration en MgCl₂. L'effet stabilisant induit par la présence de MgCl₂ n'est observé que sur le domaine DH (vert) de SpNox, avec un T_m s'élevant de 47°C en absence de ce MgCl₂ à 75°C en présence de 1M MgCl₂. Le T_m du domaine TM (bleu) de SpNox est d'environ 67°C indépendamment de la présence de MgCl₂.

On peut observer que les valeurs extraites des domaines indépendants (Fig.4.1.17) ne correspondent pas aux données d'ajustement (Tab.4.1.3) et que cette stabilisation du DH par le MgCl₂ ne semble donc pas suffisante pour permettre l'explication des profils de dénaturation observés sur la protéine entière et suggère que l'attribution des deux transitions observées en présence de MgCl₂ sur le profil de dénaturation de la protéine entière à l'un ou l'autre des domaines, réalisée au cours de ce chapitre, ne semble pas représentative de la réalité.

	Domaine non stabilisé par MgCl ₂	Domaine stabilisé par MgCl ₂ (0.25M)
Ajustement	48,7°C	57°C → 68°C
Expérimental	63°C	47°C → 75°C

Tab.4.1.3 : Récapitulatif des T_m extraits des simulations ou mesurés expérimentalement en présence ou en absence de MgCl₂. Cette difficulté pourrait être liée à des interactions existantes entre les domaines de la protéine entière, qui pourraient moduler la stabilité de chacun des domaines et complexifier l'étude de la protéine entière par l'assimilation de celle-ci à deux domaines entièrement indépendants.

c. Thermostabilité sur un mélange TM+DH

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du mécanisme de dénaturation de l'enzyme multi-domaine sous la forme entière, la thermostabilité a été évaluée en présence des domaines TM et DH en concentrations équimolaires afin d'observer s'il était possible de reproduire l'allure de la courbe de SpNox entière par la mesure de la thermostabilité en présence simultanée de chacun domaines indépendants.

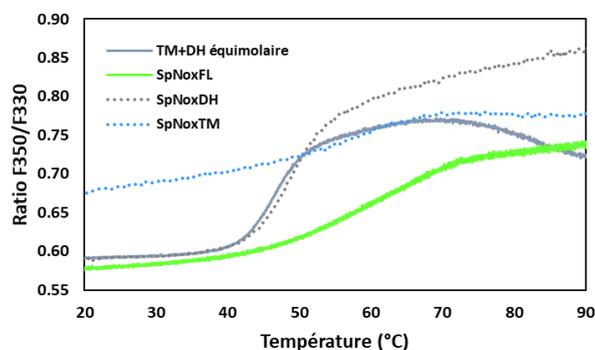


Fig.4.1.18 : Etude de la thermostabilité d'un mélange équimolaire des domaines TM et DH. Courbe de dénaturations mesurées sur SpNox_{FL} (1mg/ml, 20μM) sous forme entière (vert) et un mélange équimolaire (44μM) des domaines isolés TM+DH de SpNox (gris trait plein). Les pointillés représentent les courbes obtenues sur les domaines isolés de SpNox TM (bleu) et DH (gris) artificiellement repositionnées pour mettre en évidence que la courbe TM+DH correspond à la somme des deux courbes.

La courbe de ratio obtenue sur le mélange équimolaire des domaines TM+DH (Fig.4.1.18) présente une transition abrupte autour de 45°C suivie d'une croissance amortie rapide jusqu'à 70° puis d'une décroissance similaire à celle préalablement imputée à l'agrégation des protéines (Chapitre 3.1), résultant ainsi en une allure générale éloignée du profil mesuré sur la protéine entière. Ainsi, il semble que le profil de dénaturation mesuré sur la protéine entière ne peut pas être reproduit par le mélange des deux domaines indépendants, pouvant ainsi suggérer qu'au sein de la protéine entière, la présence d'un des domaines pourrait avoir une influence sur la thermostabilité de l'autre.

Cette influence pourrait être médiée par une interaction éventuelle entre les domaines transmembranaire et déshydrogénase au sein de la protéine entière qui aurait un impact sur le profil de dénaturation.

Une autre explication possible des différences de comportement entre les domaines isolés et la protéine sous forme entière pourrait provenir, en raison de l'absence du DH par rapport à la protéine entière, d'un enrichissement en détergent par le domaine transmembranaire lorsqu'il est produit de manière isolée conduisant à un changement d'environnement des tryptophanes du TM par rapport à lorsque celui-ci se trouve au sein de SpNox_{FL}. En effet, les molécules de détergents présentes en quantité différentes, pourraient ainsi contribuer à masquer les résidus tryptophane de manière différente au sein de SpNox sous forme tronquée (SpNox_{TM}) ou entière (SpNox_{FL}).

d. Quantification du détergent autour de SpNox WT et SpNox_{TM}

Afin de quantifier la présence de détergent autour des constructions SpNox_{FL} et SpNox_{TM}, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée par dépôt de concentrations croissantes connues de détergent (LMNG), constituant une gamme de référence pour permettre une caractérisation semi-quantitative (Fig.4.1.19). La comparaison des échantillons déposés avec cette gamme permet d'estimer la présence de respectivement 20,3 µg soit 13,5mM de LMNG autour du domaine TM et 12,65µg soit 6,32mM autour de SpNox_{FL}, démontrant ainsi que le domaine TM isolé incorpore environ deux fois plus de détergent que la protéine entière, pouvant ainsi constituer une explication aux résultats expérimentaux obtenus sur le domaine TM isolé (Fig.4.1.18). En effet, la présence d'une quantité plus importante de détergent autour du domaine TM sous forme isolé par rapport à la protéine entière pourrait participer à masquer différemment les résidus tryptophanes au sein des deux versions de la protéine et ainsi contribuer à la différence d'allure des profils de thermostabilité entre un mélange TM+DH ou SpNox_{FL}. D'autre part, la présence de LMNG en quantité trop importante pourrait également exercer un effet déstabilisant sur le domaine TM isolé par rapport à celui-ci lorsqu'il se trouve au sein d'une forme entière de la protéine, et ainsi avoir un effet sur le profil de thermostabilité.

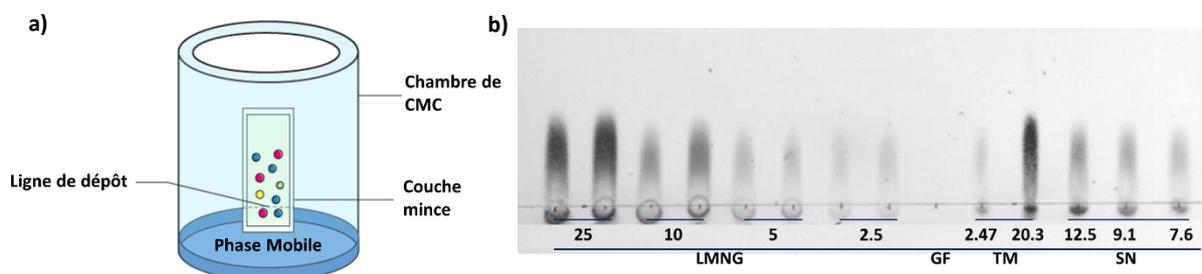


Fig.4.1.19 : Caractérisation semi-quantitative de la quantité de détergent autour de la protéine par chromatographie sur couche mince. (a) Principe de la chromatographie sur couche mince. Les échantillons sont déposés sur une plaque de silice puis la migration est réalisée dans une cuve fermée, pré-équilibrée avec un solvant contenant un mélange chloroforme/méthanol/H₂O permettant d'entraîner la phase mobile en fonction des propriétés apolaires de celle-ci. (b) Une gamme de concentrations croissantes de LMNG (25-2.5µg) ainsi que SpNox sous forme entière (SN) ou uniquement le domaine transmembranaire (TM) sont déposés sur CCM. La révélation est ensuite réalisée par vaporisation d'un mélange 50% acide sulfurique/20% éthanol sur la plaque de silice, ensuite chauffée à 200°C.

4. Caractérisation du mutant W289F

L'interprétation des résultats de nanoDSF pour SpNox est complexifiée par une transition progressive vers l'état dénaturé conduisant à l'extraction du Tm à partir d'une 1^{ère} dérivée au pic très large qui pourrait résulter d'un chevauchement partiel entre les transitions correspondant aux deux domaines de SpNox. L'utilisation du thermoFAD ne donnant uniquement accès à des informations correspondant à la dénaturation dans un environnement proche du FAD, seule la contribution du domaine DH au sein de la protéine entière a pu être observée, permettant ainsi d'étudier l'influence de la structure multi-domaine sur le signal, en revanche, aucune information n'a pu être extraite concernant le domaine TM, et une stratégie alternative a ainsi été envisagée.

Le signal de dénaturation résulte de l'ensemble des tryptophanes de la protéine entière. Or SpNox présente un seul tryptophane dans le domaine déshydrogénase, et cinq dans le domaine transmembranaire. Ainsi, afin de comparer les caractéristiques de thermostabilité du domaine TM seul ou présent au sein de l'enzyme entière, une mutation ponctuelle a été réalisée sur le tryptophane en position 289 (Fig.4.1.20), situé au niveau du cœur hydrophobe du domaine déshydrogénase, afin d'annuler la contribution du domaine DH dans le profil de dénaturation de SpNox_{FL} WT et ainsi décorrélérer la contribution de chacun des domaines au sein du profil de la protéine entière. Dans le but de conserver au mieux l'intégrité de la protéine, le tryptophane d'origine est remplacé par une phénylalanine, un acide aminé aromatique hydrophobe dont la taille est proche de celle du tryptophane afin de limiter l'impact de la mutation sur SpNox.

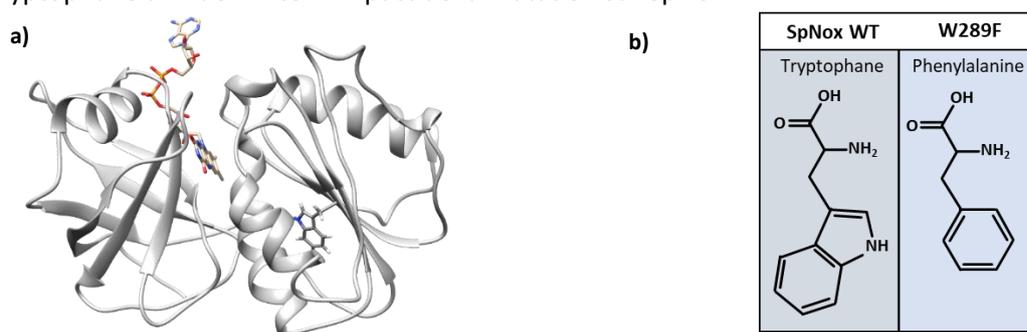


Fig.4.1.20 : Identification de l'unique tryptophane présent au sein du domaine DH de SpNox. La présence d'un seul résidu tryptophane au sein du domaine TM de SpNox permet l'élaboration d'un mutant W289F pour l'interprétation de la contribution du domaine TM au sein du profil de dénaturation de SpNox par nanoDSF. (a) L'unique résidu Trp du domaine DH, W289 (bâton) est mis en évidence dans le modèle d'homologie du DH de SpNox (gris) en présence du FAD (jaune). (b) Comparaison des résidus tryptophane et phénylalanine respectivement présents en position 289 de SpNox WT ou SpNox W289F.

A. Expression et purification de SpNox W289F

a. Expression du SpNox W289F

En raison de la position critique du W289 au centre du cœur hydrophobe du domaine déshydrogénase, une mutation de ce résidu pourrait conduire à la perte de repliement du DH. Un test d'expression du mutant W289F a été réalisé en variant les paramètres de culture (Tab.4.1.4).

Type de milieu	T (°C) de culture après induction	[IPTG] (mM)	DO _{600nm} d'induction	Temps de culture post-induction
Lysogeny Broth	20	0.2	1.05	16h
	30			16h
	37			3h30
Terrific Broth	18	0.2	1.2	De 1h30 à 16h
		1	0.8	
	25	0.5	1.2	
	37	0.2		
		1		

Tab.4.1.4 : Optimisation des paramètres de culture pour l'expression de W289F

Le western blot (Fig.4.1.21) réalisé sur les extraits bruts révèle la présence d'une bande plus intense et plus large aux alentours de 35kDa, correspondant à la protéine SpNox W289F surexprimée dans les bactéries, et dont la migration inférieure au poids moléculaire théorique (48kDa) peut, de manière à la migration de SpNox WT, être expliquée par la présence de détergent.

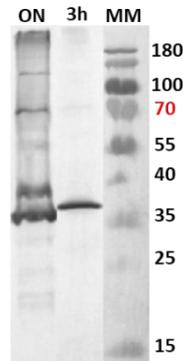


Fig.4.1.21 : Optimisation de l'expression de SpNox W289F. L'expression de SpNox W289F est détectée grâce à un anticorps anti-polyhistidine. Comparaison de l'expression de SpNox W289F en milieu TB à 25°C après induction avec 0.5mM IPTG pendant 16h (ON) ou 3h (3h).

Ainsi, d'après les tests d'expression, des paramètres optimaux de culture (induction : $DO_{600nm}=0.8$, 0.5mM d'IPTG ; culture après induction : 3heures, 25°C, milieu TB) ont pu être extraits pour la production du mutant F289W.

b. Purification de SpNox W289F

Le chromatogramme de SpNox (Fig.4.1.22.a) révèle la présence d'une quantité importante d'agrégats caractérisée par un large pic en amont du pic d'éluion du mutant (~725ml) et présentant une absorbance maximale similaire celle de la protéine éluée. Cette observation suggère une propension de la construction F289W à s'agréger. Afin d'éliminer les fractions de SpNox W289F contaminées par les agrégats, une déconvolution du chromatogramme de purification est réalisée et seules les fractions contenant l'espèce monomérique pure sous forme soluble ont été regroupées.

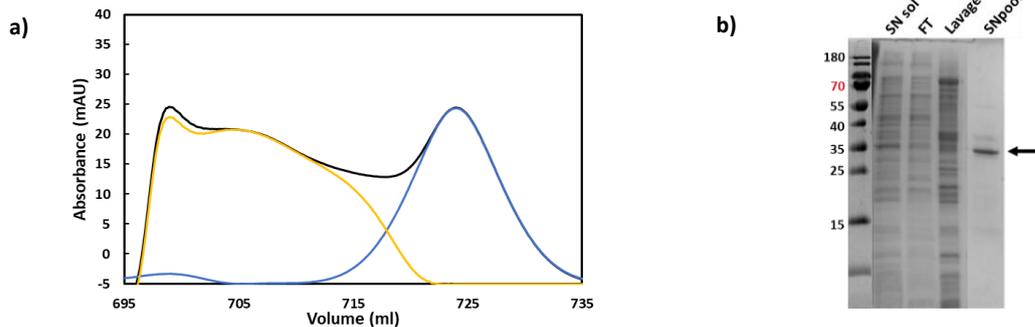


Fig.4.1.22 : Purification de SpNox W289F. (a) Le chromatogramme est obtenu par mesure d'absorbance à 280nm en sortie de chromatographie d'exclusion de taille. Les agrégats (jaune) sont décorrélés du pic principal (bleu) afin de permettre la sélection et la caractérisation des fractions correspondant à la protéine sous forme monomérique, en permettant d'identifier et d'exclure les fractions contenant un mélange d'espèces. (b) Différentes étapes de la purification, correspondant respectivement aux protéines membranaires solubilisées (SN sol.), au flow through (FT), au lavage contenant 90mM imidazole (Lavage) et au pool de monomère purifié (SNPool) sont caractérisées par migration sur gel d'acrylamide 12%. Les pistes SNsol., FT et Lavage se réfèrent à différentes étapes de la chromatographie d'affinité au nickel (chromatogramme non montré) précédant l'étape de filtration sur gel, tandis que Pool SN correspond aux fractions issues du pic principal de la chromatographie d'exclusion de taille rassemblées de manière à obtenir un mélange homogène. La flèche indique la bande correspondant à SpNox W289F.

La migration sur gel d'acrylamide (Fig.4.1.22.b) montre des profils similaires à ceux obtenus pour la purification de la protéine sauvage avec une perte d'échantillon lors de l'étape de lavage à contenant

de l'imidazole (90mM). Une bande intense correspondant à la protéine purifiée peut être observée dans les fractions regroupées (SNpool), dont la migration à ~33kDa n'indique pas la présence de bandes de poids moléculaires inférieurs qui témoigneraient d'une protéolyse qui pourrait être à l'origine de l'agrégation observée sur le chromatogramme.

Afin de vérifier l'intégrité du mutant SpNox W289F et d'évaluer la présence d'hèmes coordonnés au sein de la protéine, un spectre d'absorbance (Fig.4.1.23) a été réalisé sur les fractions purifiées rassemblées à l'issue de la chromatographie d'exclusion de taille. Celui-ci révèle la présence d'un pic à 416nm et la valeur du ratio A416/A280 de 1.7 suggère que le remplacement du résidu tryptophane en position 289 de SpNox WT par une phénylalanine au sein du mutant W289F ne semble pas impacter la coordination des groupements héminiques par le domaine transmembranaire et ainsi un repliement probablement correct de celui-ci.

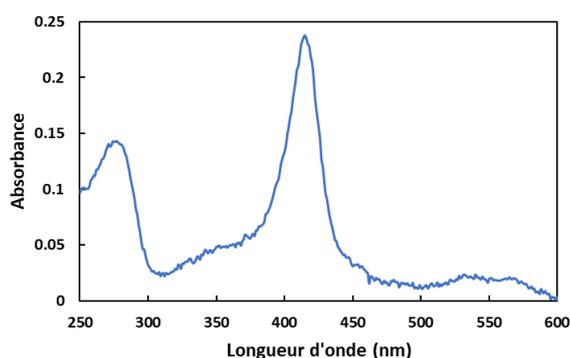


Fig.4.1.23 : Caractérisation spectrale de SpNox W289F purifiée. Le ratio en A416/A280 d'une valeur de 1.7 témoigne de la présence d'hème au sein de la protéine

c. Caractérisation de l'activité cytochrome c réductase de SpNox

Afin de vérifier la fonctionnalité et l'intégrité de SpNox_{FL} W289F, des tests d'activité cytochrome c réductase ont été réalisés. L'activité enzymatique de SpNox_{FL} W289F a été mesurée en comparaison à la protéine SpNox_{FL} WT et révèle une absence d'activité cytochrome c réductase du mutant W289F (Fig.4.1.24).

Ainsi malgré la présence des hèmes chez le mutant W289F, suggérée par le spectre (Fig.4.1.23) témoignant d'une intégrité structurale du domaine TM, la perte d'activité chez W289F semble indiquer que la mutation pourrait être impliquée dans l'activité enzymatique de SpNox ou dans le maintien de l'intégrité du domaine déshydrogénase.

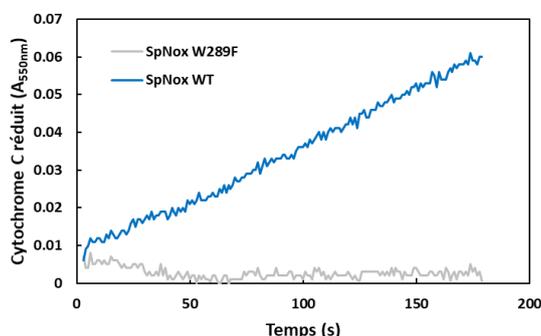


Fig. 4.1.24 : Caractérisation de l'activité cytochrome c réductase de SpNox WT et du mutant W289F. L'activité cytochrome c réductase de SpNox WT (bleu) et W289F (gris) est caractérisée dans un milieu réactionnel similaire correspondant au tampon de filtration sur gel en présence de 10µM FAD, 100µM cytochrome c, 200µM NADPH.

B. Etude de la thermostabilité du mutant SpNox W289F

a. Optimisation de la concentration de SpNox W289F pour le nanoDSF

Afin de déterminer la concentration optimale en protéine permettant d'obtenir des courbes de dénaturation interprétables, une gamme de concentration de SpNox_{FL} W289F a été réalisée. Les profils de dénaturation mesurés en fonction de la concentration sont similaires au niveau des basses températures (Fig.4.1.25.a) avec une augmentation progressive du ratio puis une transition légèrement plus rapide à partir de 50°C.

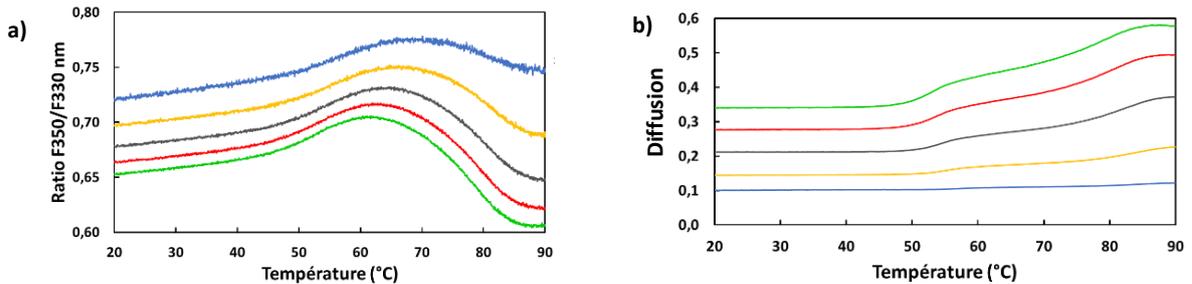


Fig. 4.1.25 : Optimisation de la concentration du mutant SpNox_{FL} W289F. (a) Evolution de l'allure des profils de dénaturation en fonction de la concentration en W289F. (b) Courbes de diffusion en fonction de la concentration en W289F. (a, b) Courbe bleue 1mg/ml, orange 2mg/ml, gris 3mg/ml, rouge 4mg/ml, vert 8mg/ml.

L'importante décroissance du ratio est observée à partir de 65°C, peut à nouveau être reliée à l'agrégation des protéines. Cependant les courbes de diffusion mesurées en parallèle par l'appareil lors de la dénaturation et traduisant le niveau d'agrégation de la protéine met également en évidence que pour les hautes concentrations en protéines, les courbes présentent un niveau initial de diffusion élevé (Fig.4.1.25.b) traduisant une propension du mutant à s'agréger à température ambiante, accéléré par l'augmentation de température comme le montre la croissance progressive des courbes de diffusion (Fig.4.1.25.b). Afin de limiter l'agrégation de la protéine et travailler avec des courbes de dénaturation permettant une détermination plus précise du T_m, une concentration de 1mg/ml de W289F, avec un T_m caractéristique de 55°C, est choisie pour la réalisation des expériences ultérieures.

Enfin, l'allure du profil de dénaturation du mutant W289F est similaire, mais décalé en température, au profil de dénaturation du domaine transmembranaire isolé (Fig.4.1.26), suggérant que l'élimination de la contribution du domaine DH au sein de SpNox_{FL} W289F permet de retrouver partiellement un comportement similaire au domaine TM.

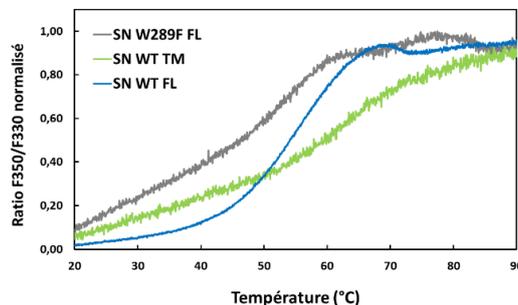


Fig. 4.1.26 : Comparaison des profils de dénaturation normalisés mesurés sur SpNox_{FL} WT, SpNox_{FL} W289F et SpNox_{TM}. Le variant W289F (gris) de SpNox permet d'annuler artificiellement la contribution du domaine DH lors de la mesure de thermostabilité par nanoDSF afin de tenter d'interpréter la contribution de chacun des domaines à l'allure globale du profil de la protéine SpNox_{FL} WT sous forme entière (bleu). Le profil du domaine TM de SpNox sous forme isolé est représenté en vert.

D'après ces résultats, il semble que le T_m du domaine transmembranaire au sein de la protéine SpNoxW289F sous forme entière soit plus faible que celui du domaine TM isolé. En revanche, la

présence des nombreux agrégats lors de l'étape de purification, suggérant une stabilité inférieure de SpNox W289F par rapport à SpNox WT, ainsi que l'absence d'activité et le profil de dénaturation plus progressif et moins bien défini, pourraient indiquer que l'intégrité du mutant W289F, notamment au niveau de son domaine DH, ne soit pas entièrement préservée et ainsi que les valeurs de T_m extraites et plus généralement conclusions globales suggérées à partir de ce mutant W289F doivent être considérées avec précaution.

b. Thermostabilité de W289F en présence d'additif

Cependant, afin d'approfondir éventuellement les observations réalisées sur SpNox en présence de $MgCl_2$, des tests ont été réalisés sur le mutant W289F avec une gamme de $MgCl_2$ (Fig.1.27.a). Les profils de dénaturation du mutant sont décalés vers les plus hautes températures en fonction de la concentration croissante en $MgCl_2$.

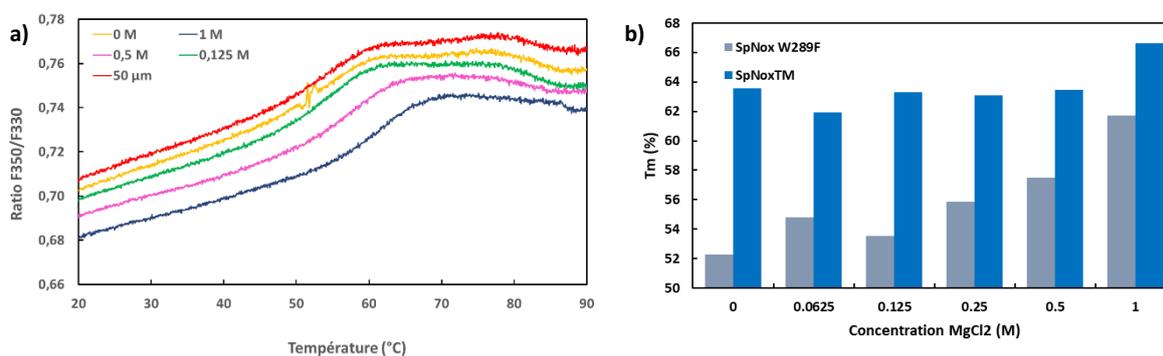


Fig. 4.1.27 : Impact du $MgCl_2$ sur la thermostabilité de SpNox W289F. (a) Courbes de dénaturation normalisées de SpNox W289F (1mg/ml) dans du tampon Tris 50mM, 300mM NaCl, 10 μ M FAD, 0,025mM LMNG à différentes concentrations en $MgCl_2$. (b) Histogramme des T_m (°C) mesurées sur SpNox W289F et le domaine TM isolé en fonction de la concentration en $MgCl_2$

Une importante évolution du T_m en fonction de la concentration en $MgCl_2$ (Fig.1.27.b) est visible pour le mutant W289F, avec une augmentation de 10°C à 1M de $MgCl_2$, alors que l'augmentation du T_m n'est que de 2°C à 1M de $MgCl_2$ sur le domaine transmembranaire seul.

Cette observation semble suggérer que la stabilisation du domaine déshydrogénase par le $MgCl_2$ observée préalablement (Fig.4.1.16) pourrait également moduler la stabilité du T_m lorsque les deux domaines sont liés au sein de la protéine entière.

5. Conclusion

La caractérisation biochimique et fonctionnelle réalisée sur les protéines issues des constructions tronquées de SpNox, respectivement SpNox_{TM} et SpNox_{DH}, semble démontrer que la limite identifiée à l'aide d'alignements multiples de séquence d'homologues de NOX, afin de définir chacun des domaines de SpNox, respectivement TM et DH, semble permettre la production de chacun des domaines indépendants sous forme stable et fonctionnelle. Ainsi, ceux-ci pourront être utilisés pour des essais de cristallogénèse qui pourraient permettre la résolution de la structure de SpNox selon une stratégie par domaine indépendant en s'affranchissant ainsi de la flexibilité observée au niveau de la charnière entre les domaines de SpNox et qui pourrait notamment contribuer à limiter la diffraction des cristaux de SpNox sous forme entière. De plus un effet stabilisant du $MgCl_2$ sur le domaine a pu être mis en évidence et pourrait favoriser la cristallisation de ce domaine permettant ainsi la résolution de sa structure. En revanche, les expériences réalisées sur un mélange équimolaire de TM et DH n'ont pas permis de reproduire et d'interpréter de manière satisfaisante les profils de thermostabilité de la protéine sous forme entière.

2

Caractérisation structurale des domaines isolés de SpNox

1. Essai de cristallogenèse sur les domaines indépendants de SpNox

A. Construction SpNox_{TM} – Domaine TM

Dans le but de cristalliser la région transmembranaire de SpNox, une étude de cristallisation en phase cubique lipidique (LCP) a été menée par la plateforme HTX Lab sur la protéine issue de la construction SpNox_{TM}, correspondant uniquement au domaine TM de SpNox. La mobilité de la protéine au sein de la phase lipidique, nécessaire à l'agglomération des molécules au cours de la formation d'un cristal à l'intérieur de la phase, peut être influencée par des nombreux paramètres, tels que l'encombrement ou la stabilité de la protéine, ainsi que par des contraintes géométriques intrinsèques à la phase, qui présente notamment une courbure importante des membranes. La vérification de ce paramètre apparaît ainsi primordiale préalablement aux essais de cristallogenèse en LCP, et la mobilité de la protéine a donc été évaluée par des mesures de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) afin de cribler les conditions dans lesquelles le domaine TM démontre la plus grande mobilité. En effet les phases LCP n'étant pas des structures rigides, il est impossible de prédire, d'après les paramètres structuraux, la capacité de diffusion d'une protéine et quels impacts peuvent avoir les contraintes spatiales sur le taux de diffusion de l'échantillon. Ainsi des cribles similaires à ceux testés pour la cristallisation en phase vapeur de SpNox WT sous forme entière (Mem_Gold, Chapitre3.2) ont été testés pour estimer la mobilité du domaine TM de SpNox.

Les premiers criblages effectués avec des fractions monomériques du domaine TM de SpNox ainsi que des fractions issues de l'épaule observé sur le chromatogramme (Fig.4.1.6.a), ont démontré que seule la fraction monomérique du TM peut présenter une mobilité au sein de certaines phases tandis que les autres états oligomériques présents au sein de l'épaule conduisent à une quantité importante d'agrégats.

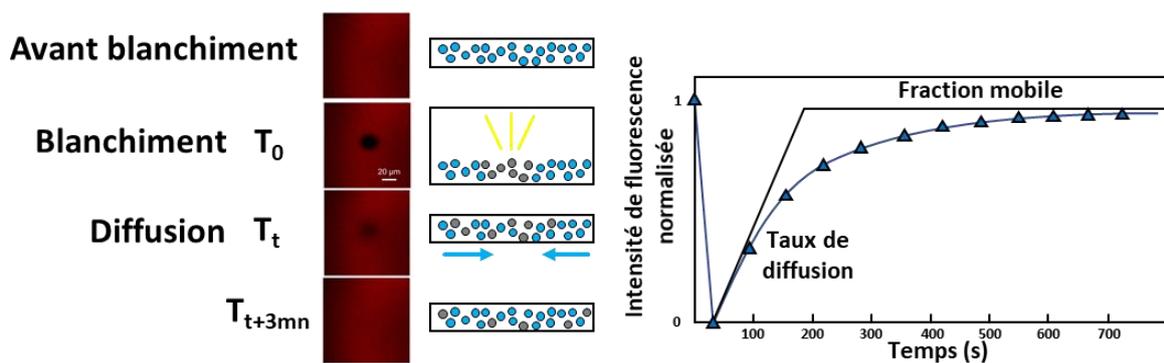


Fig.4.2.1 : Principe de la caractérisation FRAP. Avant photoblanchiment les protéines marquées au Cy3 sont localisées au sein de la phase lipidique. L'exposition des protéines flash lumineux conduit à la perte locale de fluorescence par photoblanchiment des protéines dans la phase. Les protéines blanchies se redistribuent ensuite dans l'ensemble de la phase avec une vitesse dépendante de leur mobilité et leur taux de diffusion conduisant à un recouvrement progressif de la fluorescence au niveau du point de blanchiment. Le suivi de la fluorescence locale en fonction du temps permet ainsi de suivre le recouvrement de la fluorescence et permet d'extraire les paramètres de diffusion et de mobilité de la protéine au sein de la phase.

Des mesures FRAP (Fig.4.2.1.) ont également été réalisées sur une protéine monomérique dont l'étiquette polyhistidine (His-tag) a été clivée, démontrant que les propriétés de diffusion du domaine TM sont indépendantes de la présence de l'His-tag. Ces tests ont notamment permis de révéler des

conditions adéquates (Sodium citrate + PEG400) pour la mobilité du domaine transmembranaire (TM monomère + étiquette polyhistidine) au sein des phases et un affinement autour de ces conditions a été réalisé pour les tests de cristallisation.

Cette étude a permis l'obtention d'un faible nombre de cristaux qui ont été testés sur la ligne ID24 du synchrotron Diamond et seul un objet obtenu en présence de Li_2SO_4 0.1M, 0.1M MES pH6 et 30% PEG400 (Fig.4.2.2.a) dont la coloration suggère qu'il s'agit d'un cristal de protéine mais dont la qualité de diffraction autour de 10\AA (Fig.4.2.2.b), résulte probablement du détergent et demeure dans tous les cas insuffisante pour permettre la résolution de structure du domaine transmembranaire isolé de SpNox.

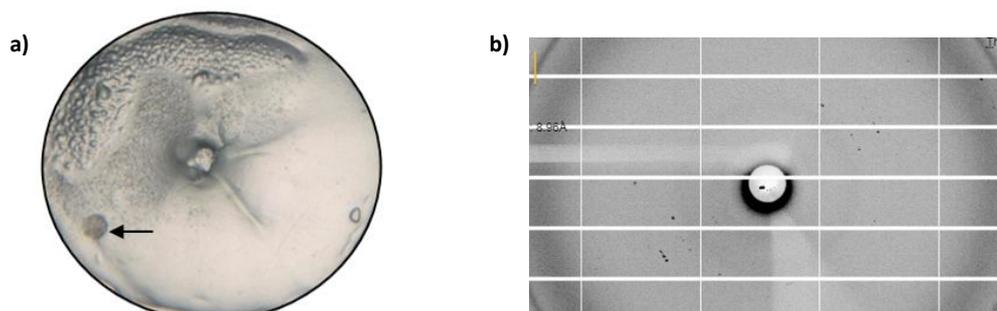


Fig.4.2.2 : Caractérisation de cristaux de SpNox_{TM} obtenus par LCP. (a) Cristal du domaine transmembranaire de SpNox isolé obtenu en LCP en présence de Li_2SO_4 0.1M, 0.1M MES pH6 et 30% PEG400. La flèche indique la position du cristal (b) Cliché de diffraction acquis sur le seul cristal présentant une diffraction des rayons X avec une limite de résolution autour de 10\AA .

Ainsi l'étude de cristallogénèse réalisée sur SpNox_{TM} n'a pas permis d'obtenir des données de qualité suffisante pour résoudre la structure du domaine TM et d'autres approches devront être envisagées pour caractériser le domaine transmembranaire de SpNox.

B. Construction SpNox_{DH} – Domaine DH

a. Criblage HTX

Afin de résoudre la structure du domaine déshydrogénase de SpNox (SpNox_{DH}), une étude préliminaire de cristallisation a été réalisée avec le soutien d'Isabelle Petit-Härtlein sur différentes versions du domaine DH à l'aide de cribles disponibles sur la plateforme HTX Lab (Chapitre 3.2). De manière similaire aux études structurales sur la protéine entière, une version mutante du domaine DH, dont le résidu F397 a subi une mutation ponctuelle en tryptophane, a été générée. Celle-ci correspond à la construction SpNox_{DH} F397W, qui a ensuite été exprimée et purifiée avec succès, puis testée pour la cristallisation haut débit. Ces essais ont conduit à l'obtention de nombreux résultats positifs (hits) permettant, indépendamment de la construction testée, respectivement WT ou F397W, la croissance de cristaux variés présentant une couleur jaune, significative de la présence de FAD au sein des cristaux.

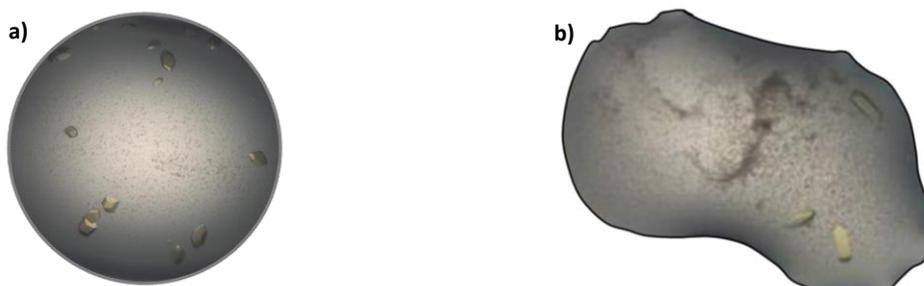


Fig.4.2.3 : Résultats du test de cristallogénèse réalisé sur les protéines SpNox_{DH} F397W et SpNox_{DH} WT sur la plateforme de cristallisation automatique du HTX Lab. (a) Exemple de cristaux du domaine DH F397W obtenus par diffusion de vapeur avec 35% PEG-MME500, 0.1M Sodium Citrate pH5. (b) Exemple de cristaux de DH WT obtenus par diffusion de vapeur avec 35% PEG-MME500, 0.1M Sodium Citrate pH5.

De plus, la forme des cristaux obtenus est également différente par rapport aux cristaux de SpNox sous forme entière (rouges hexagonaux), et pourrait éventuellement présenter une variation de l'empilement cristallin entre la protéine entière ou le domaine isolé [12]. Des essais de cristallisation ont également été menés avec la construction SpNox_{DH} F397S mais n'ont conduit à aucune cristallisation.

Les caractérisations par diffraction des rayons X menées sur la ligne ID29 de l'ESRF (European Radiation Synchrotron Facility) ont révélé des limites de diffraction de respectivement 2Å et 2.4Å pour le mutant SpNox_{DH} F397W et SpNox_{DH} WT particulièrement encourageantes pour la résolution de la structure du domaine DH, permettant notamment de déduire que la maille élémentaire correspond au groupe d'espace trigonal P4₁2₁2 (Fig.4.2.4.), avec trois molécules par unité asymétrique, et présente les paramètres de maille suivants (Tab.4.2.1.).

a (nm)	c (nm)	α (°)	β (°)	γ (°)
104.6	143.1	90	90	90

Tab.4.2.1 : Paramètres de maille représentatifs des cristaux de SpNox_{DH} F397W et SpNox_{DH} WT. Les paramètres de maille de cristaux de SpNox_{DH}, respectivement SpNox_{DH} F397W et SpNox_{DH} WT, correspondent au groupe d'espace trigonal P4₁2₁2.

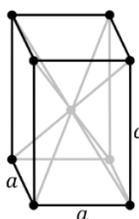


Fig.4.2.4 : Maille élémentaire du groupe d'espace P4₁ présente dans les cristaux de SpNox_{DH}, respectivement SpNox_{DH} F397W et SpNox_{DH} WT. Les paramètres de maille sont respectivement a = 104.6nm et c = 143.1nm. Tous les angles sont égaux à 90°.

b. Tentative de remplacement moléculaire

Afin de résoudre la structure du domaine DH à partir des clichés de diffraction acquis sur les cristaux natifs, une stratégie impliquant la recherche d'une solution par remplacement moléculaire (MR) a été initiée sur les meilleurs jeux de données correspondant au mutant SpNox_{DH} F397W en utilisant le modèle d'homologie du domaine déshydrogénase établi grâce aux outils bioinformatiques tels que I-Tasser ou PROMALS3D. Cependant, cette approche n'a pas permis d'aboutir à la résolution de la protéine cristallisée probablement en raison des divergences existant entre le modèle utilisé et le repliement du domaine DH dans le cristal.

En raison des similitudes structurales observées entre le modèle d'homologie du domaine DH de SpNox et la structure cristalline du domaine déshydrogénase de CsNox (500x), une nouvelle tentative a été effectuée avec le logiciel Phaser-MR [13] disponible dans la suite PHENIX [14] en sélectionnant la structure du DH de CsNox (500x) en tant que modèle de référence, cependant aucune solution satisfaisante n'a été identifiée. Les alignements de séquence entre SpNox_{DH} et le domaine déshydrogénase de CsNox indiquent que ceux-ci partagent une identité de seulement 24.3%, inférieure au seuil de 35% généralement requis [15], pouvant ainsi être à l'origine de l'échec du remplacement moléculaire.

Ainsi la recherche d'homologues du domaine déshydrogénase de SpNox a été étendue à l'ensemble des protéines disponibles sur la PDB à travers une recherche d'homologie de séquence à l'aide de l'outil PDB-Blast [16].

Structures template alignement PROMALLS3D			
Code PDB	Protéine	Commentaires	Score
500X	Dehydrogenase domain of Cylindrospermum stagnale NADPH-Oxidase 5 (NOX5) [5]	Putative ferric reductase, DH de CsNox	24.5%
1GJR	Ferredoxin-NADP+ Reductase complexed with NADP+ [17]		24.29%
1GVH	Ferric Escherichia coli flavohemoglobin [18]	Géométrie inattendue de la poche de liaison de l'hème distal	21.26%
1FNC/1FNB	Spinach Ferredoxin Reductase [19]	1ere structure résolue, utilisée car définit historiquement la famille ferredoxin-NADP+ reductase family (FNR)	21.79%
2EIX	Physarum polycephalum cytochrome b5 reductase [20]	NADH-cytochrome b5 reductase	23.11%
3A1F	NADPH binding domain of gp91(phox)	Nox2 : résidus 385-570	21.68%
Structures homologues dans [21]			
1QFJ	Fre NADP(H) Flavin oxidoreductase from E. coli [22]		17.07%
Structures homologues dans [5]			
2VNK	Ferredoxin-NADP(H) reductase from Rhodobacter [23]	Complexée avec NADP(III)	20.62%
Structures homologues issues de l'analyse Promalls-3D			
4G1V.A	S. cerevisiae flavohemoglobin		17.76%
4EH1.A	FlavoheM-like-FAD/NAD Binding Domain of Nitric Oxide Dioxygenase from Vibrio cholerae	Rang 3 (dec) Flavohaemoprotein	17.76%
4P6V.F	Na+-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A from Vibrio cholerae [24]	Rang 4 (dec)	34.62%
1TLL.B	Rat neuronal Nitric-oxide synthase reductase [25]	Rang 5 (dec) / Rang 5 (jun)	31.58%
1KRH.A	Benzoate Dioxygenase Reductase	Rang 6 (dec)	23.08%
2BN4.B	NADPH-cytochrome P450 reductase from S. cerevisiae	Rang 7 (dec)	27.05%
5GXU.A	NADPH-cytochrome P450 reductase 2 (ATR2) from Arabidopsis thaliana [26]	Rang 8 (dec)	31.82%
1DDG.B	NADPH-sulfite reductase from Escherichia coli	Rang 9 (dec) / Rang 4 (jun)	31.58%
1F20.a	FAD/NADPH-binding domain of rat neuronal nitric-oxide synthase	Rang 10 (jun)	31.58%
2BPO.B	NADPH-cytochrome P450 Reductase triple mutant : D74G, Y75F, K78A from S. Cerevisiae	Rang 6 (jun)	27.05%
1QGA.A	Pea FNR Ferredoxin NADP+ Reductase Y308W mutant in complex with NADP+	Rang 7 (jun)	25.00%
1JA1.B	NADPH-cytochrome P450 Reductase from Rat	Rang 8 (jun)	27.78%
3FJO.A	Chimeric Homo Sapiens/Yeast NADPH-cytochrome P450 reductase	Rang 9 (jun)	24.30%
Homologues issues de recherche par PSI-Blast			
5OGX	Cytochrome P450 reductase	Rang 3 cover 83%	23%
4UAJ	Crystal structure of NGRF	Rang 1 cover 55%	26%
5CQX	FlavoheMoglobine	Rang6 cover 57%	26%
4E1H	FlavoheM-like-FAD/NAD Binding Domain of Nitric Oxide Dioxygenase from Vibrio cholerae	Rang 9 cover 72%	23%
500x	Dehydrogenase domain of Cylindrospermum stagnale NADPH-Oxidase 5 (NOX5)	Rang 13 cover 59%	27%

Tab.4.2.2 : Liste des homologues du domaine déshydrogénase de SpNox (SpNox_{DH}) identifiés pour le remplacement moléculaire. Des homologues du domaine DH de SpNox constituant de potentiels candidats en tant que structure de référence pour le remplacement moléculaire ont été répertoriés. Les structures partageant une homologie avec SpNox_{DH} de 30%, proche du seuil conseillé pour l'utilisation comme référence pour le succès du processus de MR, sont indiqués en gras. Les rangs indiqués correspondent au classement donné par les différents serveurs lors des recherches de modèles d'homologie.

De plus, des homologues ont également été proposés en considérant les protéines utilisées pour la construction du modèle d'homologie, des séquences identifiées dans la bibliographie, ainsi que des structures mises en évidence par le serveur I-tasser [27] afin d'identifier des modèles adaptés pour le remplacement moléculaire présentant des taux d'homologie avec la séquence de SpN_{ox}_{DH} supérieurs à 30%. Le tableau (Tab.4.2.2.) détaillant les meilleurs homologues identifiés indique que les protéines issues de l'analyse Promalls-3D présentent les meilleurs taux d'homologie de séquence avec le domaine DH de SpN_{ox}, avec des valeurs comprises entre 30 et 34.5%. En revanche, aucune structure disponible ne présente un pourcentage d'homologie de séquence avec le DH SpN_{ox} supérieur à 35%, constituant la limite à partir de laquelle le taux de réussite du processus de remplacement moléculaire chute drastiquement [15].

Des résultats prometteurs ont pu être obtenus grâce au serveur de modélisation automatique de structure protéique Pipeline Buccaneer [28], caractérisé par la prise en compte des orientations de la densité électronique de la structure utilisée comme référence pour identifier les positions de plus haute probabilité des carbones C α de la protéine étudiée. Le résultat de cette identification aboutit à une liste de groupement d'acides aminés orientés, fournissant ainsi, pour le processus de reconstruction de la structure, des informations supplémentaires par rapport aux habituelles liste de positions. En revanche cette approche nécessitant un effort conséquent d'affinement manuel, une stratégie alternative a été recherchée.

c. Détermination des phases des cristaux

En absence de solution triviale obtenue par remplacement moléculaire, la détermination expérimentale des phases de la protéine par des approches *de novo* s'est révélée nécessaire pour la résolution de la structure du domaine DH de SpN_{ox}. Parmi les différentes méthodes développées permettant d'acquérir les phases de la protéine, la diffusion anormale simple (SAD) ou multiple (MAD) est une approche couramment employée pour la cristallographie des protéines [29, 30] nécessitant la présence d'atomes lourds, généralement incorporés dans le cristal de manière artificielle. Dans le but d'acquérir des données SAD sur les cristaux de SpN_{ox}, l'incorporation de molécules d'I3C (acide 5-Amino-2,4,6-triiodo isophtalique) [31], un composé développé spécifiquement pour le phasage des protéines et permettant d'atteindre un niveau suffisamment élevé de signal anormal grâce à la présence de trois atomes d'Iode organisés selon un triangle équilatéral (Fig.4.2.5), a été effectué par co-cristallisation ou par trempage des cristaux.

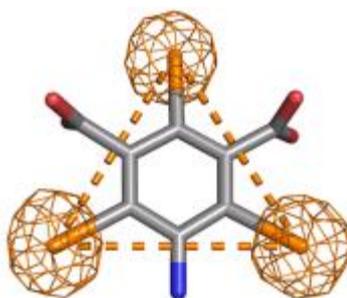


Fig.4.2.5 : Structure du composé de phasage I3C (Triangle magique). Le composé de phasage I3C, également désigné comme Triangle magique, est composé de 3 atomes lourds d'Iodes formant un triangle équilatéral de côté de 6.0Å qui peut être aisément identifié au sein de la carte densité électronique et ainsi être utilisé en tant que diffuseur anormal pour le phasage lors d'expérience de diffusion anormale à une seule longueur d'onde SAD (Single wavelength Anomalous Dispersion).

Cependant la plaque de co-cristallisation n'a conduit à aucune croissance cristalline, tandis que la caractérisation par diffraction des rayons X des cristaux trempés dans une solution d'I3C a révélé des limites de diffraction entre 2.5Å et 4Å, supérieures à celles du cristal natif. Ces résultats semblent donc

indiquer que la présence d'I3C dans la solution de cristallisation ne permet pas l'obtention de cristaux et que le changement de solution mères des cristaux de SpNox DH lors du trempage présente un impact défavorable sur la qualité de diffraction.

Les composés halogénés tels que les ions iodure et bromure ont été identifiés comme étant favorables à la cristallisation de SpNox lors des criblages d'additifs réalisés sur la protéine entière. De plus, en raison de leur fort pouvoir de diffusion anormale [32, 33], ceux-ci constituent une alternative intéressante pour les mesures de diffraction SAD, habituellement réalisées en présence de métaux lourds. Des plaques d'affinement ont ainsi été conçues pour tester la cristallisation du domaine DH (SpNox_{DH} WT et SpNox_{DH} F397W) avec 0.2M de bromure de sodium ou d'iodure de sodium.

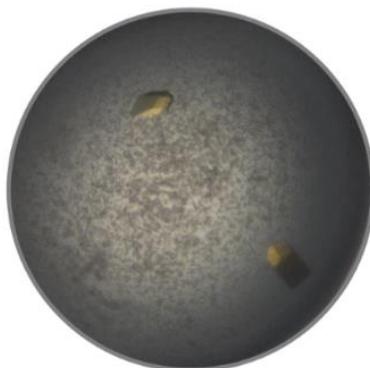


Fig.4.2.6 : Résultat du test de co-cristallisation de la protéine SpNox_{DH} F397W en présence de bromure de sodium pour l'acquisition de données anormales. Exemple de cristaux du domaine DH mutant SpNox_{DH} F397W obtenus par diffusion de vapeur avec 35% PEG-MME500, 0.1M Sodium Citrate pH5, 0.2µl de bromure de sodium (0.2M) ont été ajoutés à la goutte de ratio 1µl protéine/1µl de solution de puits.

Aucun cristal n'a été obtenu par co-cristallisation avec l'iodure de sodium, en revanche, cette stratégie a conduit à de gros cristaux en présence de bromure de sodium (Fig.4.2.6) dont les jeux de données, acquis sur la ligne ID30B de l'ESRF, possèdent une limite de résolution autour de 1.8Å avec un signal anormal de qualité suffisante pour permettre la résolution de la structure du domaine DH F397W.

2. Résolution des structures³ de SpNox_{DH} F397W et SpNox_{DH} WT

A. Structure de SpNox_{DH} F397W

Le travail de résolution et d'affinement du modèle du mutant a été réalisé en collaboration avec le HTX Lab. à l'aide des logiciels Crang2, Refmac [34] et Buster [14], permettant de déterminer la structure du domaine DH de SpNox F397W à une résolution de 1.83Å.

Le processus d'affinement est réalisé par itérations sur l'ensemble des réflexions à l'exception d'un jeu de réflexions de référence restreint, conservé comme référence, essentiel à l'évaluation de la fiabilité du modèle. Pour la résolution de structure, un modèle atomique de la protéine est construit puis un cliché de diffraction simulé est calculé à partir de ce modèle. Le calcul du facteur R permet alors d'évaluer l'accord entre la diffraction théorique issue du modèle et les données expérimentales de diffraction. Un modèle composé d'atomes dont le placement est réalisé complètement au hasard présente alors un facteur R de 0.63 tandis que les facteurs des modèles les plus précis tendent habituellement vers 0.2 [35]. Le facteur R des cristaux du domaine DH de F397W présentent une valeur de 0.206 (Tab.4.2.3), indiquant la très bonne qualité de la structure affinée du domaine DH. Le facteur R_{free} est quant à lui calculé sur le jeu de réflexions de référence et le ratio R/R_{free}, égal à 0.807 dans le

³ Les structures présentées dans ce chapitre sont en attentes de publication et certaines sont encore en cours d'affinement

cas du DH de F397W démontre que les données de diffraction n'ont pas été suraffinées et que la densité électronique extraite des jeux de diffraction est fiable.

Data Collection Statistics	
Longueur d'onde (Å)	1.8
Groupe d'Espace	P4 ₁ 2 ₁ 2
Paramètre de Maille Élémentaire	a = b = 104.4Å c = 142.5Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Résolution (Å)	35.73-1.83
Réflexions Uniques	65969
Complétude (%)	93.7
Rapport Signal/Bruit (I/ σ)	x
R _{merge} ^b (%)	5.020
Statistiques de l'Affinement de Structure	
Résolution (Å)	35.73-1.83
Facteurs d'Affinement	
Used Reflections/free	62658/3311
R _{cryst}	0.2372
R _{free}	0.2653
RMSD from ideality	
Angles des Liaisons (°)	0.010
Longueur des Liaisons (Å)	0.98
Graphique de Ramachandran (%)	
Régions les plus favorables	x
Régions additionnelles	x
Régions interdites	x
Facteur B moyen (Å ²)	39.59

Tab.4.2.3 : Valeurs des paramètres issus de l'affinement structural de SpNox_{DH} F397W. Cette structure n'a pas encore été déposée sur PDB et les paramètres d'affinement encore non calculés sont indiqués avec un x.

La structure résolue de SpNox_{DH}F397W montre la présence de trois molécules dans l'unité asymétrique du cristal (Fig.4.2.7.a) qui ne présentent pas de différence significative comme le montre l'alignement structural réalisé sur les trois structures respectives présentes au sein du motif élémentaire (Fig.4.2.7.b), excepté entre les résidus A357 et G365, correspondant à une région flexible non résolue pour l'une des molécules.

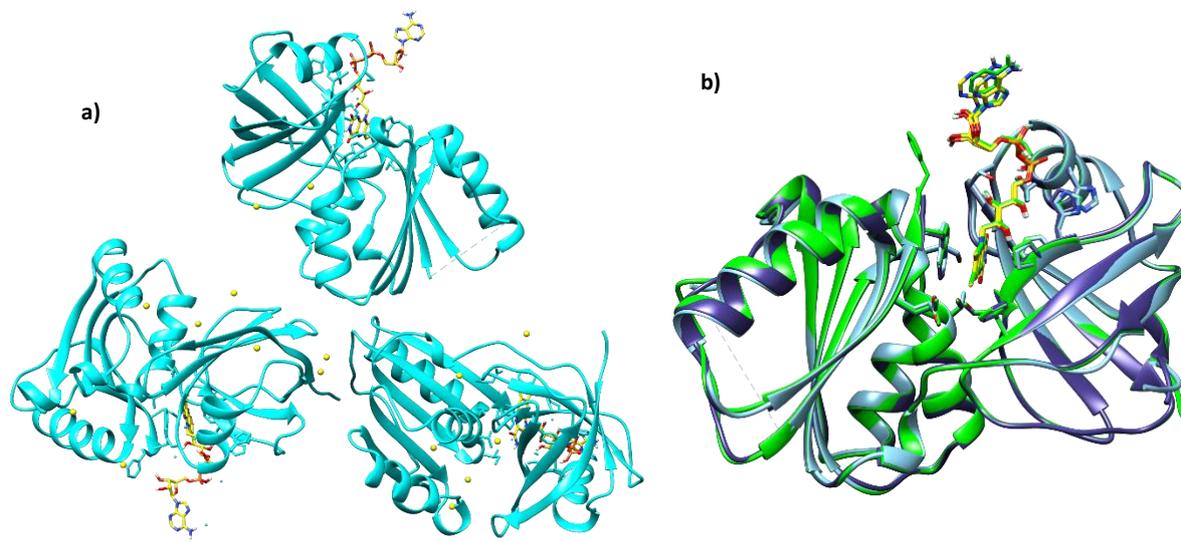


Fig.4.2.7 : Structure cristalline du domaine DH de SpNox F397W résolue à 1.83Å. (a) Trois molécules par unité asymétrique sont présentes au sein de la maille élémentaire selon une organisation triangulaire. $R_{work}/R_{free} = 0.206/0.239$. Les ions bromure utilisés pour l'acquisition des données SAD sont représentés en jaune. (b) Superposition des trois molécules présentes au sein de l'unité asymétrique. Le FAD est représenté (bâtons, jaune).

B. Structure de SpNox_{DH} WT

La structure de SpNox_{DH} F397W résolue à 1.8Å est ensuite apparue comme un candidat idéal pour réaliser une tentative de remplacement moléculaire sur les données de diffraction issues des cristaux de SpNox_{DH} WT, présentant une limite de résolution de 2.4Å. J'ai ainsi initiée cette stratégie avec le soutien d'un membre de l'équipe, Michel Thépaut, à l'aide des logiciels MOLREP pour le remplacement moléculaire puis l'affinement du modèle a été réalisé grâce au logiciel Refmac. La structure du domaine déshydrogénase de SpNox WT a ainsi pu être résolue à une résolution de 2.5Å ainsi que les paramètres suivants (Tab.4.2.4) :

Data Collection Statistics	
Longueur d'onde (Å)	2.4
Groupe d'Espace	P4 ₁ 2 ₁ 2
Paramètre de Maille Élémentaire	a = b = 104.4Å c = 142.5Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Résolution (Å)	46.9-2.5
Réflexions Uniques	26155
Complétude (%)	99.96
Rapport Signal/Bruit (I/ σ)	x
R _{merge} ^b (%)	x
Statistiques de l'Affinement de Structure	
Résolution (Å)	35.73-1.83
Facteurs d'Affinement	
Used Reflections/free	24778/1377
R _{cryst}	0.20356
R _{free}	0.29050
RMSD from ideality	
Angles des Liaisons (°)	x
Longueur des Liaisons (Å)	x
Graphique de Ramachandran (%)	
Régions les plus favorables	x
Régions additionnelles	x
Régions interdites	x
Facteur B moyen (Å ²)	68.053

Tab.4.2.4 : Valeurs des paramètres issus de l'affinement de la structure de SpNox_{DH} WT. Cette structure n'a pas encore été déposée sur PDB et les paramètres d'affinement encore non calculés sont indiqués avec un x.

De manière similaire au domaine DH mutant F397W, la résolution de la structure de SpNox_{DH} WT met en évidence la présence de trois molécules par unité asymétrique (Fig.4.2.8.a).

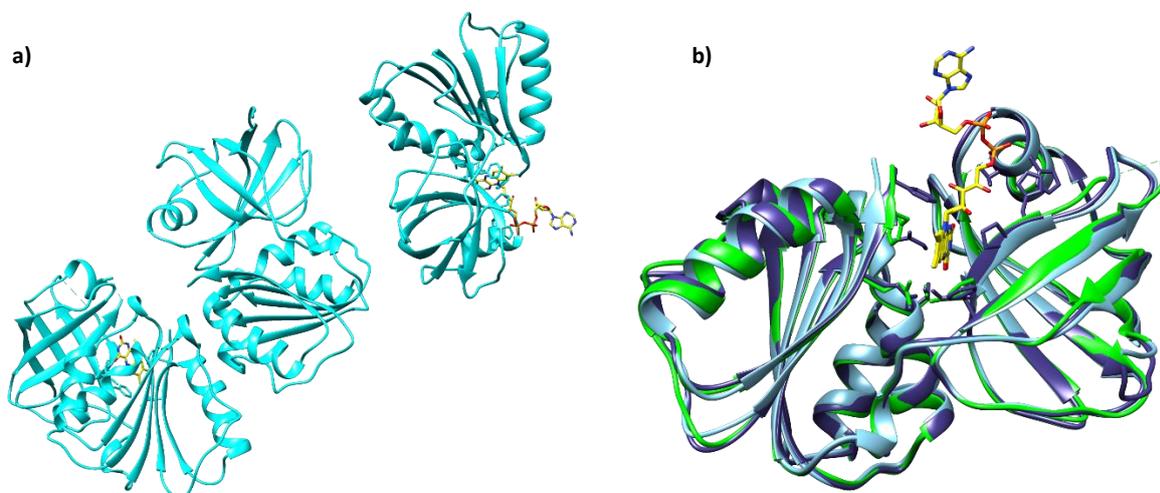


Fig.4.2.8 : Structure cristalline du domaine DH de SpNox WT résolue à 2.5Å. (a) Trois molécules sont présentes par sous-unité asymétrique et sont organisées de manière alignées. $R_{work}/R_{free} = 0.206/0.239$. (b) Superposition des trois molécules présentes au sein de l'unité asymétrique. Le FAD est représenté en jaune (bâton)

Les différences observées avec SpNox_{DH} F397W résulte d'une définition différentes des unités asymétriques par les différents programmes utilisés pour résoudre ces deux structures (Fig.4.2.7.a et 4.2.8a), cependant les empilement cristallins sont identiques au sein de SpNox_{DH} F397W (Fig.4.2.7.a).

Les trois molécules de la sous unité asymétrique, alignées structurellement entre elles ne présentent aucune différence significative (Fig.4.2.8.b), à l'exception de la région comprise entre Gly227-Ser230, non résolue pour l'un des trois domaines DH, pouvant ainsi indiquer une certaine flexibilité de la région dans le cristal de DH WT.

C. Analyses préliminaires des structures de SpNox_{DH} WT et F397W

L'analyse des empilements cristallins réalisés avec les constructions du domaine déshydrogénase SpNox_{DH} WT (Fig.4.2.9.a) et SpNox_{DH} F397W (Fig.4.2.9.b) démontre une haute compacité au sein des cristaux de protéine avec un accès relativement limité du solvant

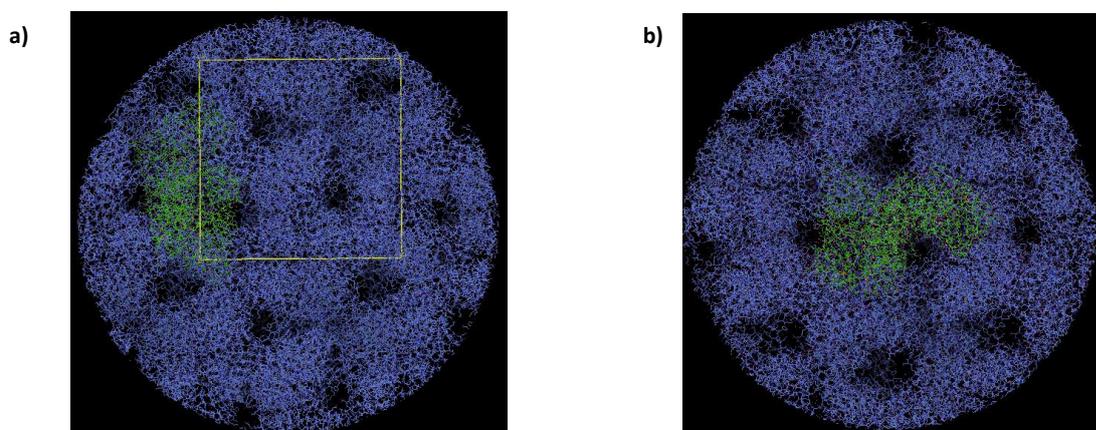


Fig.4.2.9 : Empilement cristallin au sein des cristaux du domaine déshydrogénase de SpNox_{DH} F397W ou SpNox_{DH} WT. L'empilement cristallin au sein des cristaux a été inspecté manuellement dans Coot et révèle que l'unité asymétrique contient trois molécules répétées au sein de la maille selon un motif périodique. L'unité asymétrique principale est affichée en vert, les symétriques au sein de la maille ont été générés (bleu) et permettent de visualiser l'encombrement cristallin peuplé conférant un accès au solvant limité. (a) SpNox_{DH} WT (b) SpNox_{DH} F397W

Les structures résolues des domaines DH de SpNox WT et F397W révèlent également que dans une des trois molécules, le ligand FAD, co-cristallisé avec la protéine est également engagé dans une interaction de type « π -stacking » impliquant deux autres molécules au sein du cristal (Fig.4.2.10.a,b), mettant en jeu les histidines H198 (chaîne X) et H206 (chaîne Y) de la protéine (Fig.4.2.10.a), indiquant ainsi l'importance du ligand pour la cristallisation de la protéine. En revanche, l'ensemble de la densité électronique associée au cofacteur FAD apparaît sous la forme continue seulement au sein d'une molécule sur trois de l'unité asymétrique. L'analyse des données indique que lorsque la densité électronique ne permet d'obtenir le FAD entièrement résolu au niveau de son site de liaison, un seul contact semble pouvoir être établi avec une molécule avoisinante (chaîne X), ce qui semble insuffisant pour parvenir à fixer de manière stable la flavine (Fig.4.2.10.c,d).

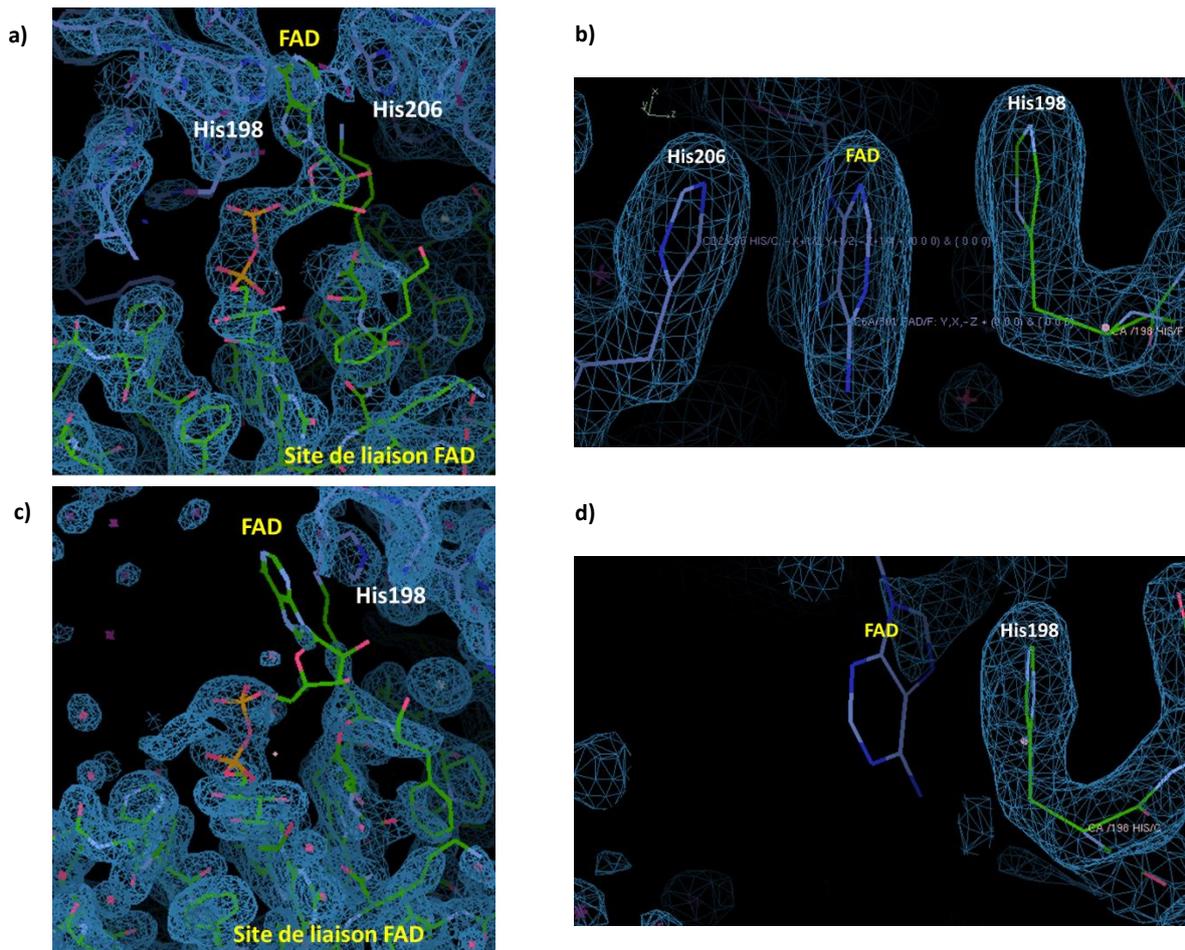


Fig.4.2.10 : Détails atomiques des contacts cristallins induit par le cofacteur FAD réalisées au sein des domaine DH de SpNox ou SpNox F397W résolues respectivement à 1.8 et 2.4Å. (a) Dans les cristaux de SpNox_{DH} WT et F397, le FAD peut établir des contacts interprotéiques avec deux autres molécules voisines par liaison π avec les résidées His206 (Chaîne Y) et His198 (Chaîne X) (b). (c) Dans les molécules de la sous unité asymétrique ou le FAD ne peut être résolu entièrement, seul le contact avec l'His198 (Chaîne X) d'une seconde protéine est établi (d).

Un second type de contact inter protéique peut également être observé au des cristaux de SpNox_{DH} F397 à travers les interactions indépendantes de deux molécules (chaîne X et Z) de la sous unité asymétrique avec un ion bromure introduit dans les cristaux pour le phasage (Fig.4.2.11).

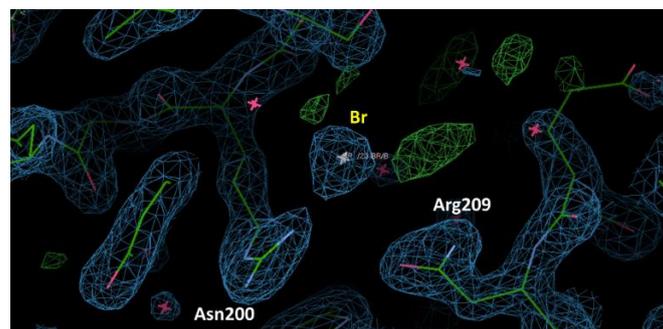


Fig.4.2.11 : Détails atomiques des interactions avec les ions bromures réalisées au sein du domaine DH de SpNox F397W. Les résidus Asn200 d'une protéine et Arg209 d'une protéine voisine interagissent avec un ion bromure présent dans le cristal pour le phasage.

L'alignement des structures de SpNox_{DH} WT et SpNox_{DH} F397W met en évidence le repliement identique des deux protéines (Fig.4.2.12.a), excepté au niveau de l'extrémité C-terminale des constructions où la substitution introduite chez le mutant F397W du domaine déshydrogénase conduit à un rapprochement du résidu W397 vers le FAD par rapport au F397 initialement présent au sein du

DH WT, tandis que l'observation à une autre position (résidu 399), choisie pour la réalisation d'une autre mutation indique que le F399, initialement orienté dans la direction du cofacteur au sein du DH WT, se trouve éloigné à plus de 10Å du FAD au sein du mutant du domaine déshydrogénase SpNox_{DH} F397W (Fig.4.2.12.b). Ainsi, ces modifications structurales pourraient être à l'origine d'une modulation de l'affinité de liaison au cofacteur au sein de la protéine variante SpNox_{DH} F397W.

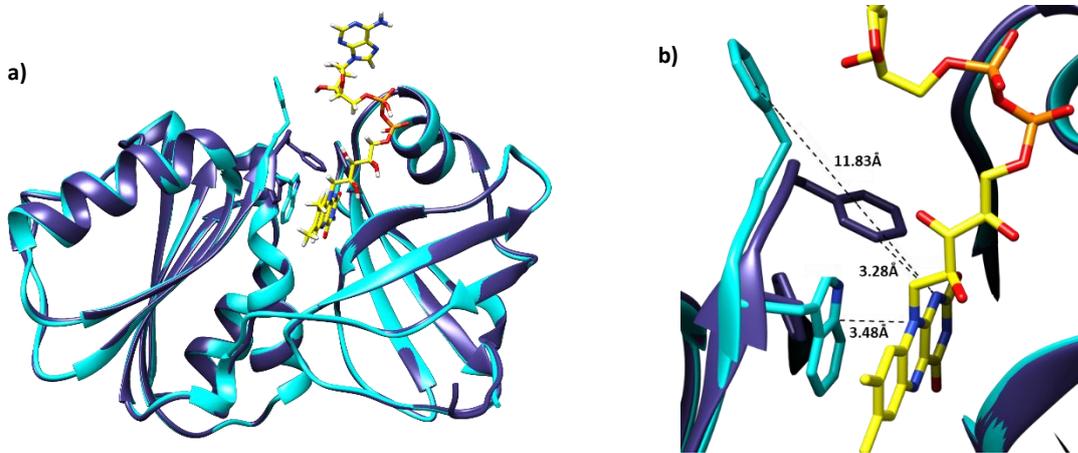


Fig.4.2.12 : Comparaison des structures du domaine déshydrogénase SpNox_{DH} WT ou F397W révélant l'implication du résidu en position 397 dans le mécanisme d'activation. (a) Superposition des structures hautes résolutions de SpNox_{DH} WT (bleu foncé) et SpNox_{DH} F397W (cyan). (b) Détails de l'interaction du FAD au niveau de son site de liaison au sein de SpNox_{DH} F397W. Le FAD (jaune) et les résidus impliqués dans l'interaction (pointillé) sont représentés sous forme de bâtons.

L'analyse de l'interaction entre le FAD et la SpNox_{DH} WT montre que le cofacteur est stabilisé au niveau des cycles isoalloxazines principalement par les résidus P234-S236, et au niveau des groupements phosphates par les résidus H255-T256.

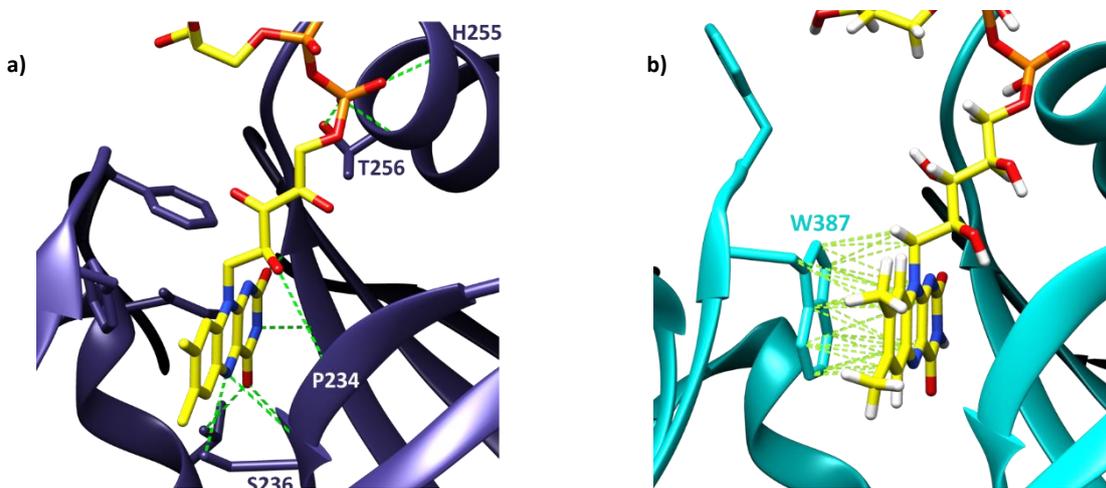


Fig.4.2.13 : Détails atomiques des résidus impliqués dans l'interaction du cofacteur FAD au sein de son site d'interaction dans la structure du domaine déshydrogénase SpNox_{DH} WT ou F397W. (a) Détails de l'interaction du FAD au niveau de son site de liaison au sein de SpNox_{DH} WT. Les pointillés verts représentent les liaisons hydrogènes entre le DH et le FAD (b) Liaison supplémentaires stabilisantes du FAD avec W387 présentes dans le mutant. Les pointillés jaunes représentent les pseudoliaisons entre le FAD et le résidu W297 visualisées dans Chimera.

Des interactions identiques existent également au sein de la version mutée du domaine déshydrogénase SpNox_{DH} F397W, en revanche, on peut observer que le résidu P397 initialement orienté à l'opposé du FAD dans le DH WT (Fig.4.2.13.a) est situé, après mutation en W397, de manière parfaitement alignée et parallèle avec les cycles isoalloxazines du cofacteur pour réaliser une interaction de type « π -stacking » (Fig.4.2.13.b). Les implications d'une telle interaction sur le mécanisme enzymatique, ainsi que les liens potentiels entre structure et fonctions de SpNox feront l'objet d'une étude plus approfondie dans le chapitre suivant.

La co-cristallisation du FAD avec la protéine permet également d'observer l'orientation particulière du cofacteur au sein du domaine déshydrogénase, indiquant que la partie adénosine du cofacteur est dirigée vers l'extérieur du domaine, en direction du domaine TM. Cette caractéristique semble être en accord avec les interactions présumées du FAD avec le domaine TM, en particulier au niveau de la boucle B entre les hélices 2 et 3 [36].

De plus la structure du FAD, visible dans son intégralité pour seulement une molécule SpNox_{DH} (SpNox_{DH} WT ou SpNox_{DH} F397W) sur trois présentes dans l'unité asymétrique, ce qui pourrait être expliqué par une possible mobilité relative du cofacteur dans les cristaux du domaine DH de SpNox en absence de domaine transmembranaire. Cette hypothèse pourrait alors confirmer une interaction entre le FAD et le domaine TM de la NADPH oxydase.

Enfin, la structure du domaine DH a été alignée avec le modèle d'homologie développé précédemment ainsi qu'avec la structure du domaine déshydrogénase de CsNox. On peut remarquer que le modèle bioinformatique présente très peu de différences structurales (RMSD : 1.653) (Fig.4.2.14.a) par rapport à la structure cristalline en comparaison des divergences importantes observées dans le cas de la version tronquée de CsNox (RMSD : 2.015) (Fig.4.2.14.b). Ces résultats tendent à montrer que le modèle prédit de SpNox présente une meilleure qualité prédictive que la structure résolue de CsNox et aurait pu fournir une meilleure référence pour le remplacement moléculaire de SpNox, bien qu'aucune des deux stratégies ne se soit révélée concluante.

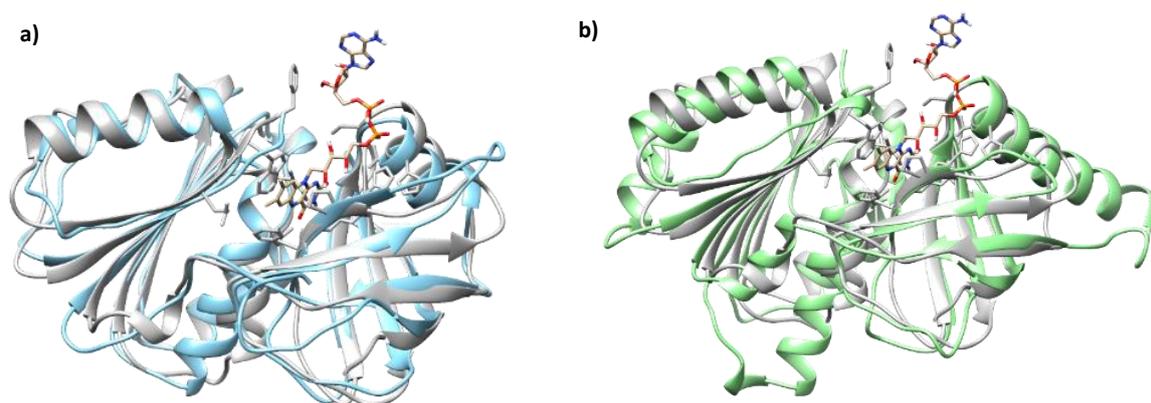


Fig.4.2.14 : Structure du domaine DH de SpNox F397W résolue à 1.8Å alignée avec la structure du domaine DH du modèle d'homologie ou avec le domaine DH de CsNox. (a) Alignement structural de SpNox_{DH}F397W (gris) avec le modèle d'homologie de domaine DH de SpNox (bleu) produit par une approche bioinformatique. (b) Alignement structural de SpNox_{DH}F397W (gris) avec la structure du domaine DH de CsNox (500X) (vert) [5]. La co-cristallisation en présence de FAD permet d'observer que le FAD lié au domaine DH de SpNox F397W pointe vers l'extérieur, en direction du domaine TM de SpNox.

3. Conclusion

L'approche consistant à exprimer et caractériser les domaines de SpNox de manière indépendante a permis la résolution de la structure haute résolution du domaine déshydrogénase de SpNox, homologue de NOX2 qui permettra d'initier une étude structure fonction sur les détails moléculaires de la liaison des substrats et cofacteurs à la protéine déclenchant le transfert d'électrons. En revanche, ce travail n'a pas permis de déterminer la structure du domaine transmembranaire et de nouvelles stratégies sont ainsi envisagées, telles que notamment l'utilisation de nanobodies, qui face à la taille réduite des boucles du TM de SpNox, pourraient permettre la réalisation de contacts cristallin de meilleure qualité.

RESULTATS

Etude structure fonction

V

Le domaine déshydrogénase des NOX, incorporant les sites de liaison au NADPH et au FAD, présente un rôle majeur dans l'initiation du transfert d'électrons du NADPH au sein de l'espace cytosolique vers l'oxygène extracellulaire. Ainsi la résolution de la structure du domaine déshydrogénase au sein des constructions correspondant aux domaines DH WT et F397W de SpNox a permis l'initiation d'une étude structure fonction principalement concentrée sur les résidus semblant être impliqués lors les étapes de transfert d'électrons du NADPH vers le FAD, ainsi que du FAD vers l'hème proximal, à travers la conception de mutants de SpNox spécifiques et la réalisation de mesures d'affinité de ces variants pour le substrat NADPH et les cofacteurs dérivés de flavine.

1. Mécanisme d'ouverture/fermeture du site de liaison au NADPH régulant l'activité oxydase

A. Analyse structurale

Afin d'étudier les mécanismes permettant la liaison des coenzymes NADPH et FAD au sein de leur site de liaison respectif, ainsi que les premières étapes du transfert d'électron, la structure du NADPH, non résolue dans les cristaux du domaine DH de SpNox (SpNox_{DH} WT) a été ancrée par alignement structural avec une FNR (Ferrédoxine-NADP⁺ réductase) de pois co-cristallisée avec le ligand (1QFZ). L'ancrage du NADPH place le cycle nicotinamide du substrat au contact du FAD, correctement aligné pour permettre un transfert d'électron, suggérant ainsi un positionnement du NADPH au sein du domaine DH de SpNox compatible avec la réalité (Fig.5.1.1.a). L'observation de l'extrémité du C-terminale (C-ter) de SpNox démontre que le résidu F397 de la construction WT (SpNox_{DH} WT) du domaine déshydrogénase de SpNox bloque partiellement le site de liaison NADPH (Fig.5.1.1.b) suggérant ainsi que la protéine a été cristallisée dans un état inactif et qu'un changement conformationnel semble nécessaire afin de démasquer le site de liaison du substrat. Un mécanisme de régulation semblable a été observé au sein du domaine FNR de la NADPH-cytochrome P450 réductase, dans lequel un résidu tryptophane est en interaction par une liaison π avec les cycles du FAD, bloquant

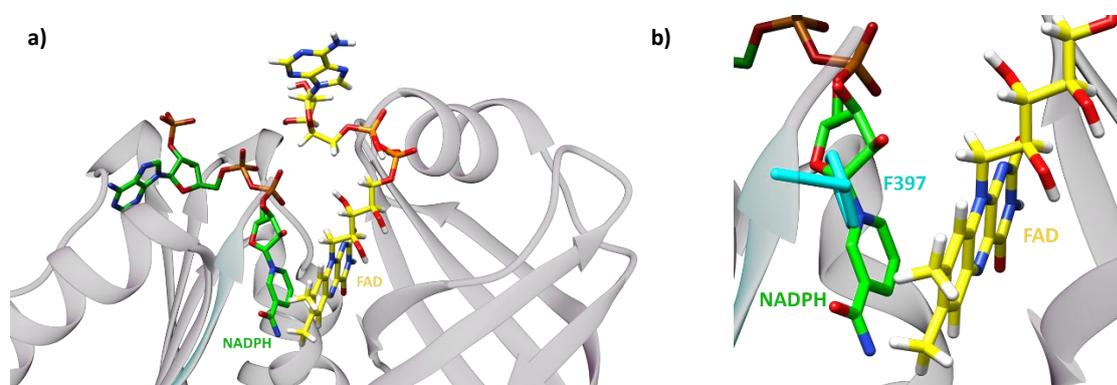


Fig.5.1.1 : Ancrage du NADPH au sein de la structure du domaine de SpNox. (a) L'ancrage du NADPH, réalisé par alignement structural de la structure du domaine DH de SpNox (SpNox_{DH}) avec la structure de FNR de pois (1QFZ) place le substrat NADPH (vert) au contact du FAD (jaune). (b) Le résidu F397 (vert) au sein de la structure du domaine DH de SpNox WT (gris) semble partiellement bloquer l'accès au site de liaison du NADPH, indiquant que des réarrangements structuraux seraient nécessaires pour permettre l'interaction du substrat NADPH (vert) avec son motif de liaison.

ainsi l'accès du NADPH, et nécessitant alors différents types de réarrangements structuraux majeurs pour permettre la liaison du substrat [1].

En revanche, l'activité de SpNox étant indépendante de la présence des facteurs cytosoliques capables d'induire des changements conformationnels au sein des NOX, il apparaît probable que la libération de l'accès au site de liaison du NADPH implique un simple phénomène de flexibilité intrinsèque de l'enzyme.

Ainsi afin d'étudier la flexibilité de l'extrémité C-ter de la protéine qui pourrait éventuellement participer à réguler au site de liaison au NADPH en modulant la position de la chaîne latérale du résidu F397, les trois molécules présentes dans l'unité asymétrique au sein du cristal ont été alignées structurellement. L'observation au niveau du résidu F397 révèle un mouvement maximum de ce résidu entre les différentes molécules caractérisé par une torsion de 22° ainsi qu'une translation maximum de 1.63Å supérieur d'un facteur 2 au RMSD calculé par alignement structural des trois molécules entre elles (0.7Å), et traduisant l'écart moyen résidus par rapport à la structure de référence, suggérant une flexibilité locale au niveau du site actif à travers le mouvement de F397.

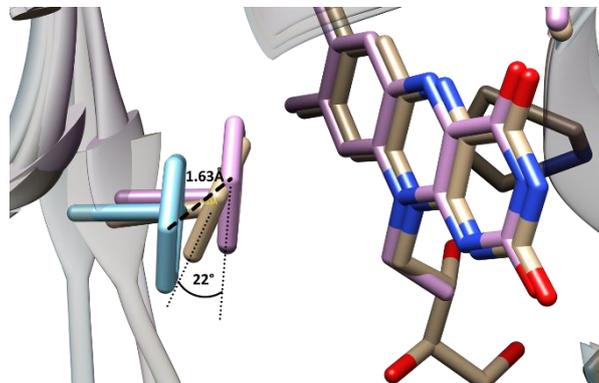


Fig.5.1.2 : Comparaison du positionnement des résidus F397 au sein des trois molécules présentes dans l'unité asymétrique du cristal de SpNox_{DH} WT. La comparaison entre les 3 résidus F397 au sein des 3 molécules asymétriques présentes au sein du cristal du domaine DH WT, une translation de 1.63Å et une rotation de 22° sont observées. Le cycle isoalloxazine ainsi que la variation de l'orientation du plan du cycle aromatique de F397 au sein des 3 molécules de l'unité asymétrique sont visualisées sous forme de bâtons.

L'analyse du site de liaison du FAD au sein de la structure cristalline du mutant du domaine déshydrogénase de SpNox F397W a mis en évidence l'existence d'une interaction de type π -stacking entre la région isoalloxazine du cofacteur FAD et le cycle aromatique du résidu W397. En accord avec les travaux de Deng et al. [2] et la perte d'activité observée chez le mutant F397W, il serait envisageable que l'existence de ce type d'interaction avec le cofacteur stabilise le résidu tryptophane W397 au sein du site de liaison, empêchant ainsi le positionnement du substrat NADPH, et restreignant alors l'activité enzymatique.

La comparaison des structures résolues pour les deux constructions du domaine déshydrogénase de SpNox, respectivement SpNox_{DH} WT (Fig.5.1.3.a) et SpNox_{DH} F397W (Fig.5.1.3.b), montre qu'en absence du NADPH, la phénylalanine F397 native occupe partiellement la position en face du FAD, normalement adoptée par le substrat NADPH. En revanche, contrairement au tryptophane W397, substituant cette phénylalanine au sein du DH muté, et dont la présence favorise une interaction avec le FAD à environ 3.6Å, l'orientation du cycle aromatique de SpNox_{DH} F397, selon un angle de 40° par rapport au plan du cycle isoalloxazine de la flavine à une distance de 4.6Å, ne permet pas l'interaction avec le cofacteur FAD [3]. Dans ces conditions, selon la dynamique de conformation du résidu F397, l'accès au site de liaison au NADPH à l'extrémité C-ter du domaine DH, peut ainsi être modulé, permettant alors une activité enzymatique normale et ainsi d'expliquer les différences d'activité

relevées entre les constructions sous forme entière de SpNox WT, fonctionnelle, et F397W, dont l'activité est limitée.

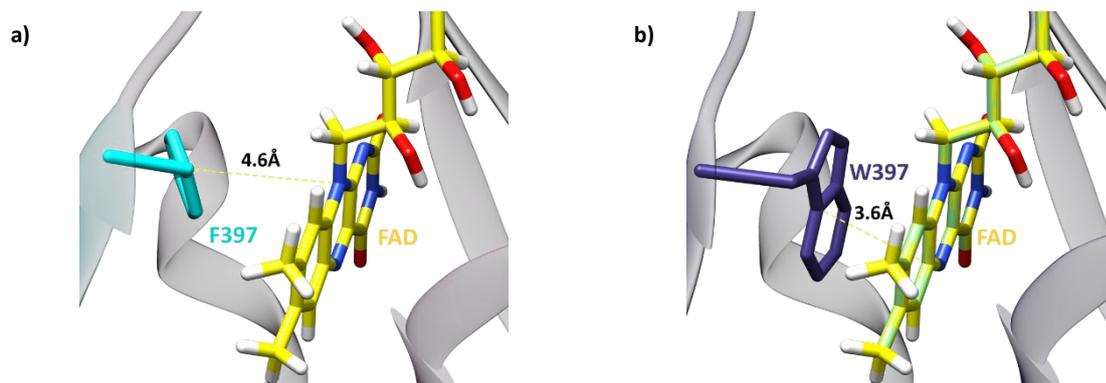


Fig.5.1.3 : Comparaison du positionnement des résidus F397 (WT) et W397 (variant) par rapport au FAD au sein du domaine déshydrogénase de SpNox. (a) Le résidu F397 bloque l'accès du NADPH mais n'établit pas d'interaction avec le FAD au sein du DH WT de SpNox. (b) Le résidu muté W397 bloque l'accès du NADPH et l'interaction de type π -stacking réalisée avec les cycles du FAD semble stabiliser le résidu tryptophane qui occupe alors le site de liaison au NADPH contribuant ainsi à limiter l'activité cytochrome c réductase du mutant. Le résidu F397 (cyan), W397 (violet) et le FAD (jaune) sont représentés sous forme de bâtons.

Ces caractéristiques semblent ainsi mettre en évidence un mécanisme d'ouverture/fermeture opéré au sein du domaine déshydrogénase de SpNox WT par le résidu F397, dont les mouvements seraient capables de réguler l'accès au site de liaison du NADPH pour permettre l'initiation de la catalyse du transfert d'électrons à travers la membrane.

B. Mesure d'affinité pour le NADPH et le NADH

Afin de vérifier cette hypothèse, des mesures d'affinité pour le NADPH ont été réalisées a été réalisée sur SpNox WT et SpNox F397W, respectivement sous forme entière (SpNox_{FL}) ou sous la forme tronquée (SpNox_{DH}) correspondant aux différentes versions domaines déshydrogénases isolés (Fig.5.1.4). De même, le mutant F397S, correspondant au remplacement du résidu phénylalanine par un résidu non aromatique d'encombrement stérique moindre, a été étudié pour valider l'influence exercée par la nature de l'acide aminé à cette position.

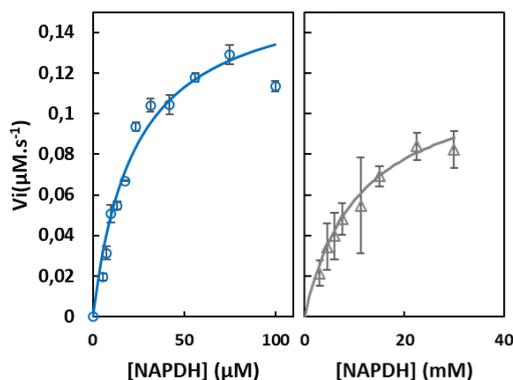


Fig.5.1.4 : Caractérisation de l'affinité de SpNox WT et des mutants F397W, F97S et F399W sous forme entières et tronquées pour le NADPH et le NADH. Courbes de Michaelis et Menten obtenues pour les constructions de SpNox sous forme entière, respectivement SpNox_{FL} WT (bleu) et SpNox_{FL} F397W (gris), en présence d'une gamme croissante de NADPH, respectivement exprimée en μM (gauche, SpNox WT) ou en mM (droite SpNox F397W). Les courbes en trait plein correspondent aux ajustements obtenus à partir des paramètres K_m et V_m extraits avec Prism.

Les résultats obtenus sur les deux types de constructions, respectivement entière (SpNox_{FL}) ou correspondant uniquement au domaine déshydrogénase (SpNox_{DH}) montrent que la substitution de F397 en W conduit à une affinité au moins 100 fois supérieure pour le NADPH du mutant (F397W)

comparé aux constructions sauvages (WT) (Tab.5.1.1) suggérant ainsi que les interactions entre le W397 et les cycles du cofacteur FAD bloque le mécanisme d'ouverture/fermeture au sein du site de liaison du NADPH (Fig.5.1.5.b) empêchant ainsi la liaison du substrat.

	NADPH			NADH		
	K_m (μM)	K_{mDH}/K_{mFL}	V_m^*	K_m (μM)	K_{mDH}/K_{mFL}	V_m^*
SpNox _{FL} WT	43.5 ± 3	X	0.17	41.78 ± 1.8	X	0.09
SpNox _{DH} WT	106 ± 9.3	2.4	0.5	133.2 ± 4.3	3.18	0.4
SpNox _{FL} F397W	8230 ± 233	X	0.73	10920 ± 168	X	0.12
SpNox _{DH} F397W	12210 ± 278	0.68	0.45	20020 ± 214	1.83	1.57
SpNox _{FL} F397S	33.76 ± 3.2	X	0.28	29,62 ± 9	X	0,34
SpNox _{DH} F397S	79.35 ± 5.4	2.35	0.38	66.93 ± 4.4	3.22	0.57
SpNox _{DH} F399W	86.7 ± 4.9	x	0.83	216.18 ± 4.9	X	0.52

Tab.5.1.1 : Valeurs de K_m et V_m pour le NADPH et le NADH mesurées pour les constructions sous forme entière SpNox_{FL} WT, F397W ou F397W ou correspondant aux différentes versions du domaine DH isolé (SpNox_{DH}). K_{mDH}/K_{mWT} désigne le ratio entre le K_m mesuré sur le domaine DH et le K_m mesuré sur la protéine sous forme entière pour une même construction (WT, F397W ou F397S). ($*V_m$ est exprimé en $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$).

A l'inverse, la mutation ponctuelle du résidu F397 en sérine n'affecte pas l'affinité pour le NADPH (Fig.5.1.4.b). Ce résultat semble montrer que malgré l'existence du mécanisme d'ouverture/fermeture, l'occupation stérique limitée de la sérine et l'absence d'interaction avec le FAD permet un accès sans restriction du NADPH au sein du site de liaison, ne permettant donc pas de réguler la liaison du substrat et donc l'activité oxydase de SpNox (Fig.5.1.5.c). Le résidu F397 de SpNox étant hautement conservé à travers toute les séquences de NOX eucaryotes et procaryotes d'après les alignements multiples réalisés au cours de ce projet, il apparaît probable que ce mécanisme de régulation (Fig.5.1.5.a) existe au sein de l'ensemble des enzymes de la famille des NADPH oxydases de manière similaire aux enzymes de type FNR (Ferrédoxine-NADP+ réductase) [4].

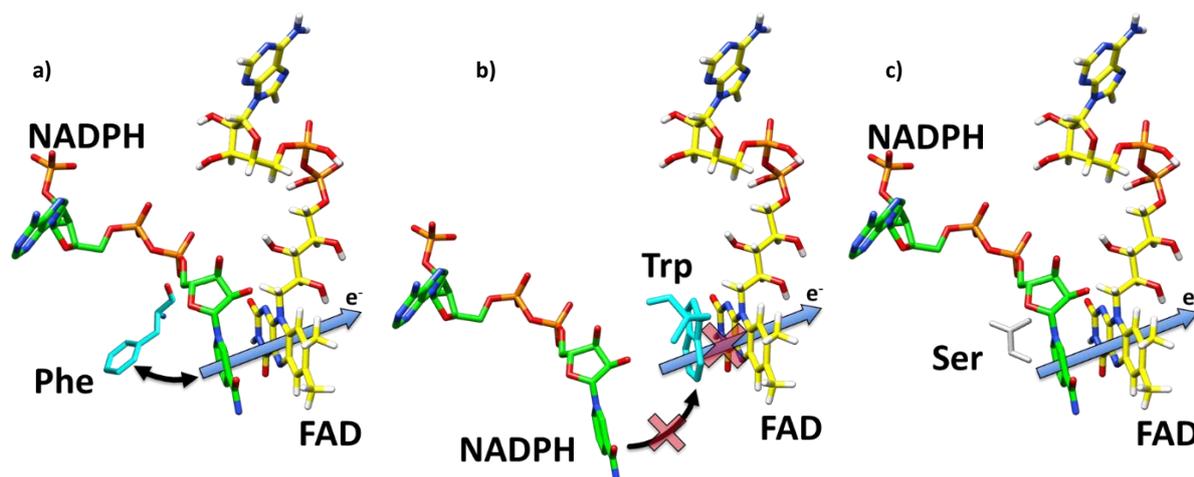


Fig.5.1.5 : Schéma du mécanisme d'ouverture/fermeture du site de liaison au NADPH en fonction de la nature du résidu occupant la position 397 de SpNox. (a) Le F397 initial occupe partiellement le site de liaison au NADPH, et pourrait se déporter pour autoriser l'accès du NADPH afin de permettre le transfert d'électron du NADPH au FAD. (b) Le résidu W397 est stabilisé au sein du site de liaison NADPH par des interactions avec le FAD, occupant le site de liaison au NADPH, qui n'est alors pas disponible pour accueillir le substrat. L'interaction établie entre W397 et le FAD limite ainsi le renouvellement du NADPH au sein de l'enzyme et conduit ainsi une activité enzymatique réduite. (c) La S397 ne présente pas le caractère aromatique requis ni l'encombrement stérique nécessaire pour occuper le site de liaison du NADPH. Représentation des résidus impliqués (bleu : P ou W ou gris : S), du FAD (jaune) et du NADPH (vert) sous forme de bâtons.

Des mesures d'affinité ont également été réalisées sur le domaine déshydrogénase du mutant F399W, conduisant à des valeurs de K_m et V_m relativement similaires au domaine DH WT (Tab.5.1.1). Ces résultats suggèrent que le résidu F399, en accord avec son positionnement trop éloigné par rapport au NADPH et au FAD n'est impliqué ni dans la liaison de coenzymes au sein de SpNox ni dans l'efficacité enzymatique de la protéine (Fig.5.1.6).

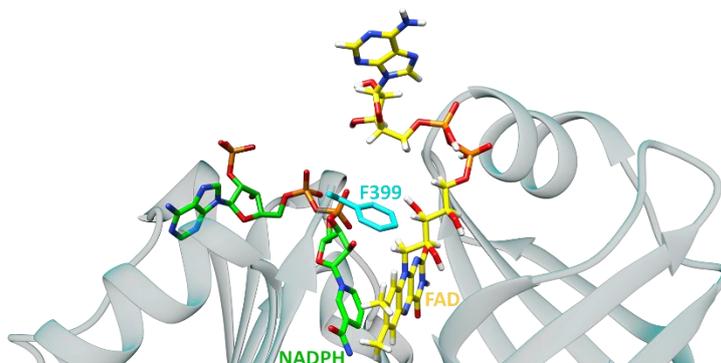


Fig.5.1.6 : Localisation du résidu F399 de SpNox par rapport aux coenzymes. Le FAD a été co-cristallisé avec le domaine déshydrogénase de SpNox ($SpNox_{DH}$, gris) tandis que le NADPH (vert) a été rajouté par ancrage artificiel grâce à l'alignement structural de la structure du DH de SpNox ($SpNox_{DH}$) avec la structure de FNR de pois (1QFZ). Le résidu F399 (cyan) ne semble pas intervenir dans la liaison des coenzymes.

Enfin les mesures d'affinité réalisées en présence de gamme croissante de NADH montrent que toutes les constructions présentent des valeurs similaires aux tests d'affinité pour le NADPH démontrant ainsi l'absence de spécificité du substrat pour la réaction de transfert d'électrons catalysée par SpNox (Tab.5.1.1).

2. Possible implication des résidu Y353 et W289 pour l'activité enzymatique

A. Implication du résidu Y353 dans la liaison au NADPH

L'ancrage du NADPH au sein de la structure cristallographique du DH WT a permis de révéler que le résidu Y353 de SpNox situé à 3.9Å du cycle adénine suggère une interaction par stacking avec l'extrémité adénosine du NADPH. Cette interaction pourrait être impliquée dans la stabilisation du substrat et dans son positionnement correct au contact du FAD. En revanche, le faible taux de conservation associé à la position 353 au sein des alignement multiples de séquences procaryotes et eucaryotes de NOX ne semble pas témoigner d'un rôle majeur dans la catalyse du transfert d'électron par l'enzyme.

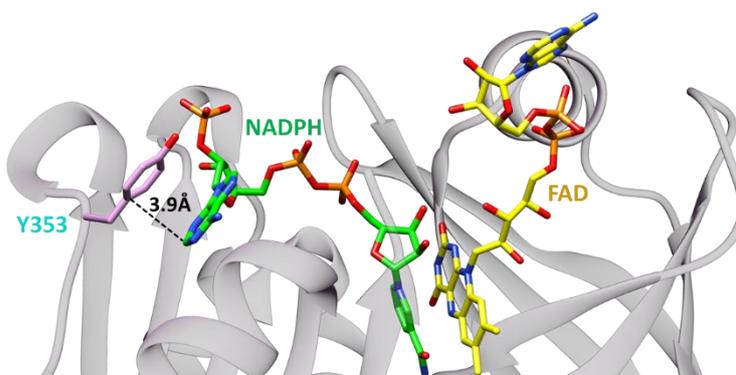


Fig.5.1.7 : Interaction du Y353 de SpNox WT avec le NADPH par π -stacking. Le NADPH a été ancré par alignement structural du domaine déshydrogénase de SpNox ($SpNox_{DH}$ WT, gris) avec la structure de FNR de pois (1QFZ). Le positionnement du résidu Y353 (rose) suggère un π -stacking avec les cycles adénines du substrat NADPH (vert).

La conception d'un mutant par substitution de ce résidu Y353 par un résidu non aromatique de taille inférieure pourrait permettre l'étude de l'implication de ce résidu dans la liaison du NADPH à SpNox.

B. Implication du résidu W₂₈₉ pour la liaison du NADPH

Le mutant SpNox W289F obtenu par mutation ponctuelle du W289 par un résidu phénylalanine, dont les propriétés d'hydrophobicité et d'encombrement sont proche du résidu natif, a révélé, malgré la présence d'hèmes au sein de son domaine transmembranaire, une perte totale d'activité suggérant ainsi un rôle essentiel du tryptophane dans l'activité de SpNox. Les courbes de stabilité ont également indiqué une possible perte d'intégrité du mutant avec une propension plus importante à s'agréger que SpNox WT, suggérant que le résidu W289 pourrait également exercer un rôle structural en participant au maintien du repliement global du domaine DH. Le résidu W289 est localisé au centre d'un cœur hydrophobe (Fig.5.1.8.a), composé de trois feuillet β et d'une hélice α selon l'ordre topologique β - α - β^2 correspondant au repliement Rossman [5] (motif de liaison du site de liaison du NADPH) dont les résidus ont été identifiés au sein de la structure cristallographique du domaine DH (Fig.5.1.8) grâce aux alignements des différentes NADPH oxydases humaines et procaryotes [6].

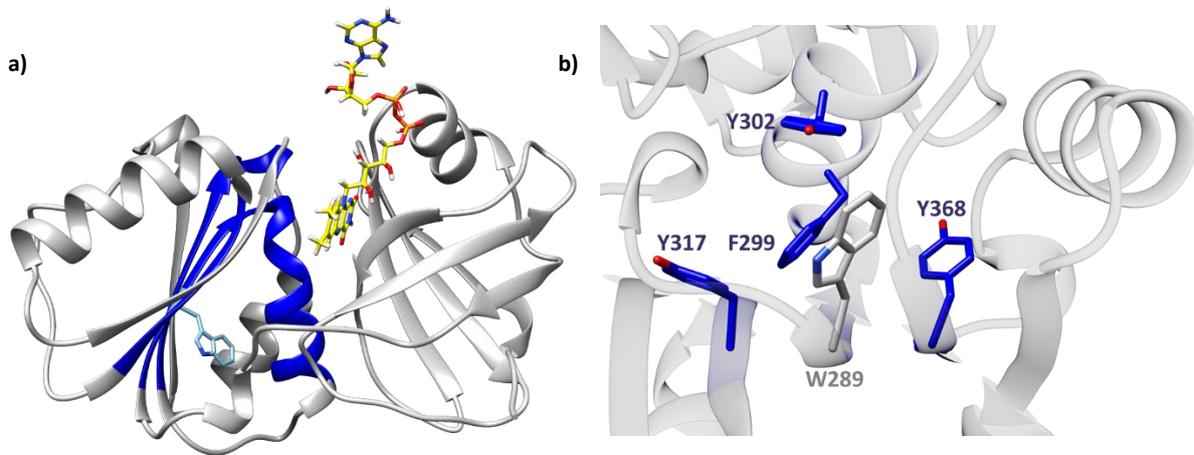


Fig.5.1.8 : Localisation du résidu W289 au niveau du site des motifs de liaison au NADPH. (a) Le W289 est localisé au centre d'un cœur hydrophobe composé des motifs de liaison au NADPH (bleu foncé). (b) Les résidus F299, Y302, Y317 et Y368 constituent une cavité hydrophobe autour du W289. La structure de SpNox_{DH} WT est représentée en gris.

La présence du résidu W289 au centre du pli Rossman suggère l'implication de ce résidu dans l'interaction avec le substrat, et par conséquent dans l'activité cytochrome c réductase de SpNox. Des travaux concernant l'implication du résidu L505 de NOX2 dans le phénotype X91⁺-CGD ont montré que ce résidu est crucial pour l'activité de la NOX humaine [7] conduisant à une expression normale de gp91^{phox} mutée, généralement associée à une perte de la conformation stable de gp91^{phox}, et identifié comme le résidu équivalent à W289 par l'alignement multiple de séquence d'homologues procaryotes et eucaryotes de NOX (Fig.5.1.9).

a)		b)			
	498	505	511	Type	Acides aminés
SpNox	EGRE	---NQVW	IAGGIGITPFISYIRE	Aliphatique / hydrophobe	ILVAM
NOX2	FSYE	---VVMLV	GAGIGVTPFASILKS	Aromatique	FWY
NOX4	LNYE	---VSLCV	VAGGIGVTPFASILNT	Positif	KRH
CsNox	FESK	---YAILI	CAGIGVTPFASILKS	Négatif	DE
				Hydrophile	STNQ
				Conformation spéciale	PG
				Cystéine	C

Fig.5.1.9 : Alignement de séquence de SpNox, NOX2, NOX4 et CsNox issu de l'alignement multiple des séquences d'homologues eucaryotes et procaryotes de NOX au niveau du résidu L505 de NOX2. (a) Le résidu W289 est surligné en blanc. La numérotation des résidus est donnée par rapport à la séquence de NOX2. (b) Légende des couleurs utilisées pour l'alignement.

En effet la mutation L505R de gp91^{phox}, caractéristique d'un cas de X-CGD perturbe d'une part l'interaction de p67^{phox} avec le cytochrome *b*₅₅₈ et augmente d'un facteur trois l'affinité pour le NADPH de NOX2 muté purifié. Il avait alors été supposé que la mutation L505R puisse perturber les

mouvements de l'hélice α et sa liaison avec p67^{phox}, empêchant une accessibilité optimale du NADPH au niveau de son site de fixation. Les résultats obtenus sur SpNox, qui ne nécessite pas l'interaction d'une sous-unité pour être activée pourrait suggérer que la mutation W289F serait susceptible d'affecter directement la liaison du substrat au domaine déshydrogénase.

Dans la structure du domaine DH de SpNox, le résidu W289 est localisé dans un environnement hautement hydrophobe composé des résidus F299, Y302, Y317 et Y368 (Fig.5.1.8.b). Ainsi, la substitution du résidu W289 par une phénylalanine pourrait avoir conduit au dépliement de cette région et à la perte d'intégrité du domaine DH dans le mutant W289F. L'évolution des propriétés de stabilité de ce mutant, analysé en nanoDSF et évoqué précédemment, semble confirmer l'hypothèse d'un effet global sur la structure plutôt qu'un effet sur la reconnaissance du substrat NADPH. Cette caractérisation sera complétée à travers la réalisation d'expérience de dichroïsme circulaire afin d'étudier l'implication du résidu W289 dans le repliement de SpNox.

3. Interaction du cofacteur FAD avec les domaines DH et TM de SpNox

A. Caractérisation des paramètres enzymatiques de SpNox_{FL} et SpNox_{DH}

La structure cristalline du domaine DH de SpNox démontre que le FAD, lié au niveau du cycles isoalloxazines au domaine déshydrogénase est orienté vers la région transmembranaire de la protéine, pouvant ainsi suggérer une potentielle interaction entre la partie adénosine du cofacteur et certains résidus des hélices du domaine TM.

De plus, l'incapacité à résoudre entièrement le cofacteur au sein de certaines molécules de l'unité asymétrique du cristal de SpNox_{DH} en raison d'un manque de densité électronique démontre qu'en absence du domaine transmembranaire, le FAD peut être absent de la protéine, suggérant que le domaine transmembranaire de SpNox (TM) puisse exercer un rôle stabilisant sur le cofacteur FAD.

Afin d'étudier l'impact du domaine TM sur la liaison du FAD au sein du domaine DH de SpNox, l'affinité pour le FAD de SpNox sous forme entière (SpNox_{FL}), caractérisée en mesurant l'activité Cytochrome c réductase pour différentes concentrations de flavines a été comparée à l'affinité du DH seul, déterminée par mesure d'activité diaphorase.

Les résultats (Tab.5.1.2), obtenus avec le soutien d'Isabelle Petit-Härtlein, démontrent que la protéine sous forme entière (SpNox_{FL}) et tronquée (SpNox_{DH}) partagent des vitesses maximales de réaction similaires. En revanche, l'absence du domaine TM conduit à une baisse d'affinité du DH pour le FAD (13.9 μ M) d'un facteur 300 par rapport à SpNox_{FL} (0.049 μ M). Ainsi le domaine TM au sein de la protéine entière pourrait, à travers l'établissement d'interactions supplémentaires avec le cofacteur, contribuer à améliorer l'affinité de SpNox pour le cofacteur FAD.

	K_m (μ M)			V_m (μ M.s ⁻¹)	
	SpNox _{FL}	SpNox _{DH}	K_{mDH}/K_{mFL}	SpNox _{FL}	SpNox _{DH}
FAD	0.049 \pm 0.01	13.9 \pm 0.3	283.67	0.15 \pm 0.05	0.3 \pm 0.08
FMN	0.91 \pm 0.06	7.9 \pm 0.3	8.68	0.095 \pm 0.02	0.26 \pm 0.07
Riboflavine	7.94 \pm 0.2	17.99 \pm 0.95	2.26	0.23 \pm 0.06	0.15 \pm 0.07
Lumiflavine	16.02 \pm 0.6	16.3 \pm 0.4	1.02	0.15 \pm 0.03	0.19 \pm 0.08

Tab.5.1.2 : Affinité de SpNox_{FL} ou SpNox_{DH} pour les flavines. Tableau des valeurs de K_m et V_m de SpNox sous forme entière (SpNox_{FL}) et tronquée (SpNox_{DH}) pour le FAD, le FMN, la riboflavine et la lumiflavine. K_{mDH}/K_{mFL} désigne le ratio entre le K_m mesuré sur le domaine DH et le K_m mesuré sur la protéine sous forme entière pour une même construction (WT).

Afin de caractériser les contributions relatives des domaines TM et DH de SpNox dans la reconnaissance du cofacteur FAD, les K_m et V_m de SpNox_{FL} et SpNox_{DH} pour différents dérivés de flavines ont été évalué à travers des mesures d'activité de réduction du cytochrome c en substituant le FAD respectivement par la partie FMN (Flavine Mono Nucléotide), riboflavine ou lumiflavine (Fig.5.1.9).

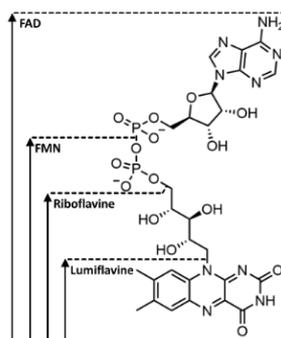


Fig.5.1.9 : Les différents dérivés des cofacteurs flavines. Description des différents cofacteurs flavines utilisés pour cette étude.

Ce travail met en évidence une perte progressive d'affinité de SpNox avec la réduction de la taille de la flavine avec une affinité de la protéine environ trois cent fois supérieure pour le FAD que pour la lumiflavine, tandis que le domaine DH conserve une affinité constante ($\sim 10\mu\text{M}$) indépendamment de l'analogue de flavine utilisé, et égale à l'affinité de SpNox pour la lumiflavine (Fig.5.1.10.a). Ces résultats suggèrent que pour le domaine DH isolé, la liaison au FAD semble principalement établie au niveau du cycle isoalloxazine du cofacteur et l'ajout de ribitol (riboflavine) puis des groupements phosphates (FMN) et d'un nucléotide adénosine (FAD) n'améliore pas l'affinité contrairement à la protéine SpNox sous forme entière, dont l'affinité s'améliore avec la taille des dérivés flavines du noyau isoalloxazine au FAD entier. La protéine semble donc interagir sur toute la longueur du cofacteur FAD, permettant ainsi d'améliorer considérablement l'affinité de la SpNox pour le cofacteur. En revanche, la vitesse réactionnelle maximale (V_m) apparaît indépendante du dérivé de flavine utilisé, suggérant que les interactions entre le TM et le FAD ne joue aucun rôle catalytique.

En conclusion, la liaison du cofacteur FAD au sein de SpNox, indispensable à la réalisation du transfert d'électrons, semble principalement s'établir par interaction du cycle isoalloxazine du FAD au sein du domaine déshydrogénase et s'étendre sur toute la longueur du cofacteur grâce à des interactions médiées par le domaine transmembranaire. Ce site de liaison au FAD partagé entre les domaines TM et DH pourrait notamment contribuer au placement correct du cofacteur pour la poursuite du transfert d'électron vers l'hème proximal.

B. Caractérisation des interactions du FAD avec le TM

Le modèle d'homologie du domaine TM de SpNox a été ancré à la structure cristalline du DH (SpNox_{DH} WT) par alignement structural. Après ancrage, la distance entre le dernier résidu en C-ter du TM et le premier résidu N-ter du DH a été évalué à 11.5\AA pour cinq résidus absents suggérant que cette représentation de SpNox sous forme entière pourrait correspondre à une conformation compatible avec les contraintes liées à la chaîne peptidique.

Ce modèle situerait ainsi l'extrémité adénosine du FAD au contact du domaine transmembranaire TM au niveau de la boucle D, à hauteur de l'hème proximal (Fig.5.1.10.a), suggérant que le cofacteur pourrait établir des interactions avec les résidus du domaine TM compris entre le I120 et I128. L'observation de la boucle D, redessinée dans le modèle du TM, montre que l'orientation de celle-ci au sein du modèle en direction du FAD n'indique pas d'incompatibilité structurale avec le cofacteur FAD, suggérant que la boucle proposée au sein de la modélisation pourrait correspondre à une

conformation présentant une réalité physiologique selon laquelle la boucle D serait capable d'interagir avec le domaine DH de SpNox (Fig.5.1.10.b).

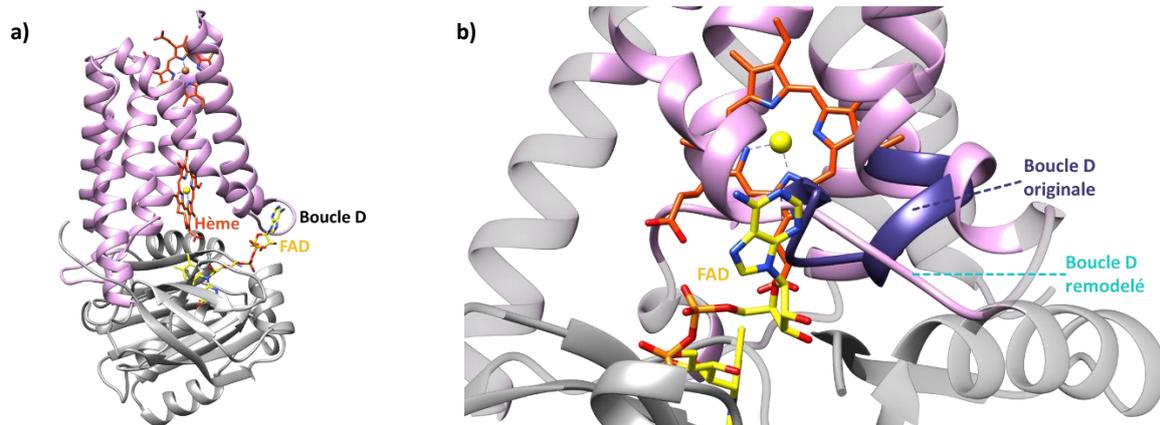


Fig.5.1.10 : Interaction du cofacteur FAD avec le domaine TM de SpNox. Le modèle d'homologie de SpNox a été ancré avec la structure de SpNox_{DH} WT à l'aide d'un alignement structural. (a) Le FAD visible dans le cristal de SpNox_{DH} WT se retrouverait, d'après le modèle établi, au contact du domaine TM au niveau de la boucle D à la hauteur de l'hème proximal. (b) La boucle D remodelisée (rose) est orientée en direction du FAD sans entraîner d'incompatibilité structurale. La boucle D originale pointant vers l'intérieur du domaine TM est également représentée (violette).

Ainsi, bien que le modèle permette d'envisager, à travers la visualisation, une organisation éventuelle des domaines et cofacteurs au sein de la protéine entière, il ne permet d'extraire que des informations putatives qui devraient être vérifiées expérimentalement, à l'aide par exemple d'approche de mutagenèse dirigée.

Parmi les résidus au contact du cycle adénine du cofacteur, l'alignement multiple des séquences de NOX a révélé une forte conservation des amino-acides aromatiques Y122_{SpNox} et W125_{SpNox} (Fig.5.1.11.b) au sein de l'ensemble de la famille des Nox suggérant un rôle important de ces résidus dans la stabilisation du FAD au niveau du domaine TM. L'étude des alignements montre également que l'arginine en position 126 de SpNox (R126_{SpNox}) est conservée au sein des Nox procaryotes et correspond également à un résidu aromatique au sein de la famille des NOX humaines (Fig.5.1.11.a).

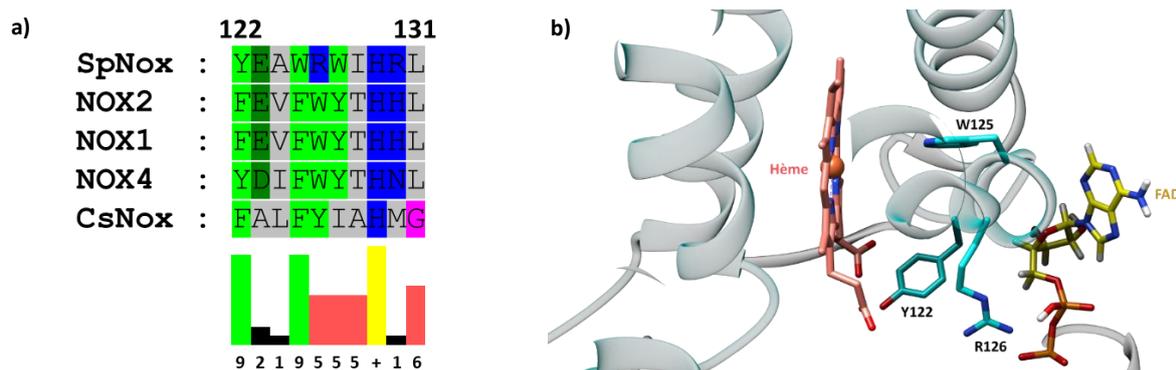


Fig.5.1.11 : Résidus du domaine TM de SpNox impliqués dans les interactions avec l'extrémité adénine du cofacteur FAD (a) Résultats de l'alignement multiples réalisé sur les homologues eucaryotes et procaryotes de NOX dans la région des résidus 122-131 du domaine TM de SpNox. La numérotation est donnée par rapport à la séquence de SpNox. (b) Les résidus conservés dans l'alignement et pouvant être impliqués dans la liaison (cyan) avec le FAD (jaune) sont affichés sous forme de bâtons sein de du modèle d'homologie de SpNox TM (gris).

Dans le but de caractériser l'influence de ces résidus sur les interactions entre la partie adénine du FAD et domaine TM de SpNox, trois mutants Y122A, W125A et R126A ont été conçues en substituant respectivement les résidus Y122, W125 ou R126 par un résidu alanine, supprimant ainsi les caractéristiques chimiques des résidus d'origine (Fig.5.1.12).

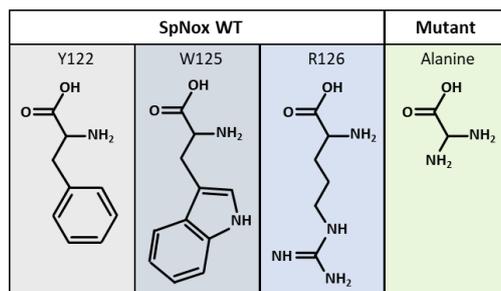


Fig.5.1.12 : Comparaison de la nature des résidus Y122, W125 et R126 avec l'acide aminé alanine de substitution. Les résidus Y122, W125 et R126 présents au sein du domaine TM de SpNox WT et conservés dans l'alignement multiple. L'étude de l'implication potentielle de ces résidus dans des interactions avec le cofacteur FAD est réalisée par substitution respective de ceux-ci avec une alanine.

L'affinité de ces mutants pour le NADPH a été caractérisée et comparée avec celle de SpNox WT indiquant que ceux-ci présentent des affinités (K_m) pour le NADPH entre 10 et 25mM du même ordre de grandeur que la protéine sauvage (13mM). En accord avec leur localisation éloignée du site de liaison au NADPH, les mutations ponctuelles réalisées n'altèrent donc pas la liaison du substrat au domaine DH et les mutants présentent, malgré des différences modérées de V_m observées, une activité suffisante pour les études d'affinité pour les flavines.

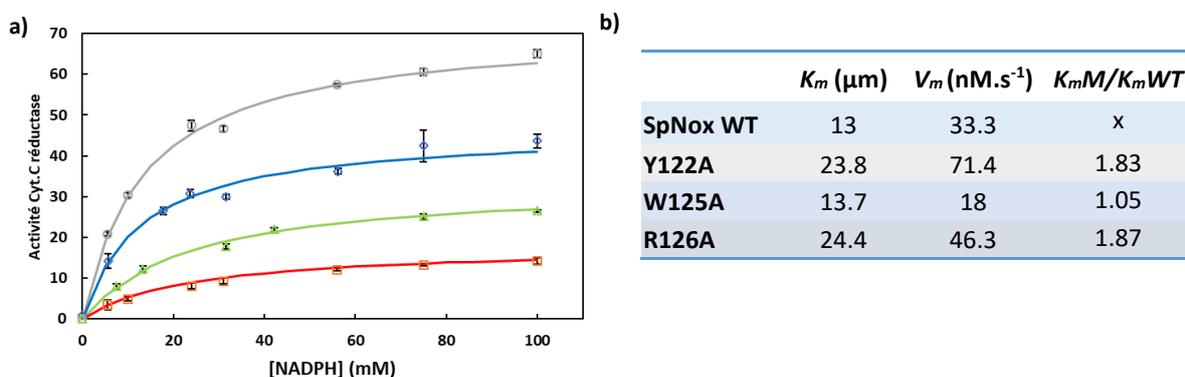


Fig.5.1.13 : Mesures d'affinité des constructions SpNox WT, Y122A, W125A, R126A pour le NADPH (a) Courbes de cinétiques enzymatiques mesurées pour SpNox WT (bleu) et les mutants Y122A (gris), W125A (rouge) et R126A (vert) en présence d'une gamme de concentrations croissante de NADPH. Représentation de Michaelis et Menten. Les courbes en trait plein correspondent aux ajustements obtenus à partir des paramètres K_m et V_m extraits par Prism. (b) Tableaux des K_m mesurés pour les quatre constructions pour le NADPH. K_mM/K_mWT désigne le ratio entre le K_m mesuré sur le mutant et le K_m mesuré sur la protéine sous forme entière.

De manière similaire à SpNox WT, les affinités des mutants Y122A, W125A et R126A pour les dérivés de flavines FAD, FMN, riboflavine et lumiflavine ont été évaluées par suivi de l'activité cytochrome c réductase en présence d'une gamme croissante de cofacteur. Les valeurs d'affinité extraites pour les différents cofacteurs flavines montre que les mutations Y122A et R126A conduisent à une baisse d'affinité pour le FAD par rapport à SpNox WT et W125A. En revanche, les dérivés de flavine dont la taille est inférieure, conduisent tous à des résultats relativement similaires, avec des affinités pour un même cofacteur semblables entre SpNox WT ou les trois mutants, suggérant ainsi que l'effet induit par la mutation semble être liée à la partie adénosine du FAD.

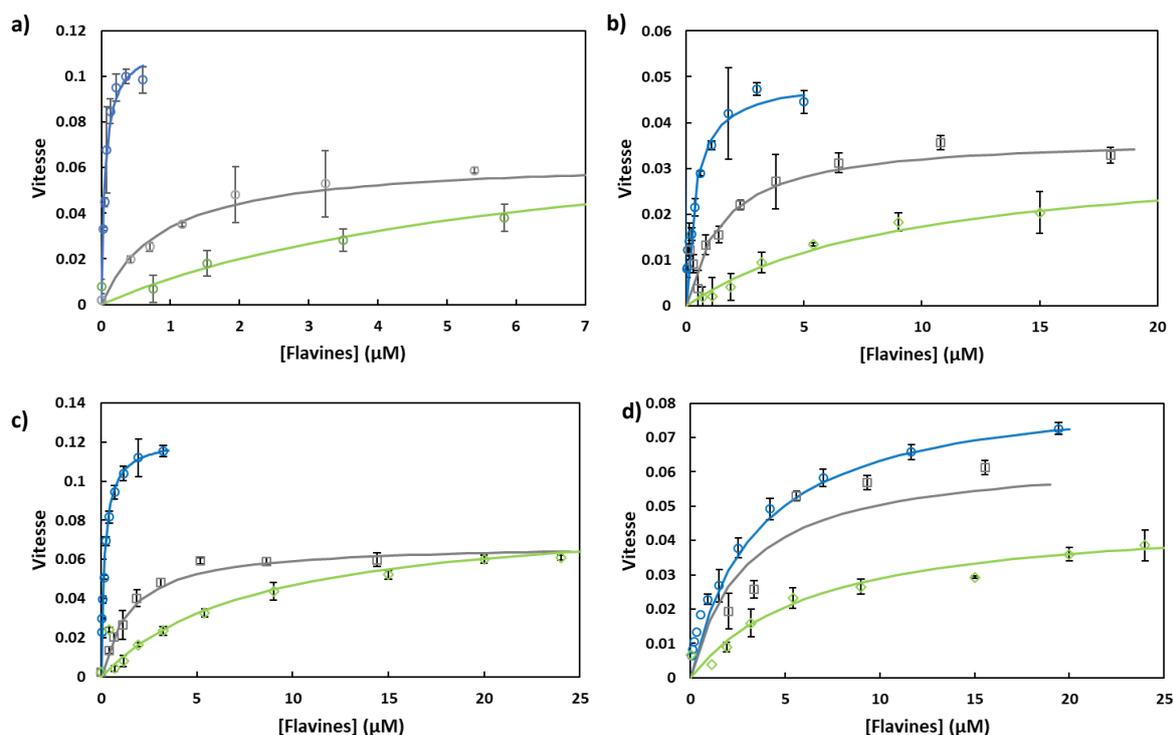


Fig.5.1.14 : Mesures d'affinité des constructions SpNox WT, Y122A, W125A, R126A pour les cofacteurs flavines. Courbes de cinétiques enzymatiques mesurés pour les mutants Y122A (a), W125A (b) et R126A (c) en présence d'une gamme de concentrations croissante de dérivés flavines FAD (bleu), FMN (gris) et Riboflavine (vert). Les courbes en trait plein correspondent aux ajustement obtenus à partir des paramètres K_m et V_m extrait par Prism.

Les mutations ponctuelles de Y122A et R126A semblent ainsi impacter les interactions entre le TM et le cycle adénosine du FAD. Les différences d'affinité des mutants par rapport à SpNox WT ont été mises en évidence en traçant le ratio des K_m pour chacun des analogues de flavines entre la protéine mutée et SpNox WT.

	K_m (μM)			
	SpNox WT	Y122A	W125A	R126A
FAD	0.059 ± 0.01	0.38 ± 0.5	0.16 ± 0.01	3.49 ± 0.3
FMN	0.89 ± 0.3	1.5 ± 0.9	1.77 ± 0.02	2.9 ± 0.48
Riboflavine	6.4 ± 0.2	9.6 ± 0.08	8.16 ± 0.54	6.63 ± 0.38
	V_m ($\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$)			
	SpNox WT	Y122A	W125A	R126A
FAD	110 ± 7	50 ± 2	11 ± 2	91 ± 2
FMN	64 ± 6	37 ± 3	63 ± 2	65 ± 2
Riboflavine	84 ± 2	34 ± 2	86 ± 1	48 ± 2

Tab.5.1.3 : Tableau des K_m et V_m mesurés pour SpNox WT, Y122A, W125A et R126A pour les cofacteurs dérivés flavines

Ainsi la mutation du résidu R126 par une alanine plus petite conduit à une affinité pour le FAD 60 fois plus élevée, alors que les mutations de la Y122 et du W125 conduisent à des pertes d'affinité négligeables (respectivement x6 et x2). En revanche, pour le FMN et la riboflavine qui ne contiennent pas la partie Adénosine, les K_m sont sensiblement les mêmes ou seulement faiblement affectées indépendamment du mutant testé, suggérant que le résidu R126 et dans une moindre mesure Y122

soient impliqués dans des interactions uniquement avec la partie adénosine du FAD confirmant les observations initiales.

Perte d'affinité par rapport à SpNox WT			
	Y122A	W125A	R126A
FAD	6.44	2.71	59.1
FMN	1.74	1.98	3.26
Riboflavine	0.77	0.58	1.18

Tab.5.1.1 : Affinité des mutants Y122A, W125A et R126A pour les cofacteurs dérivés de flavines par rapport à SpNox WT.
Tableau des valeurs correspondants au ratio des K_m mesurés pour les différentes flavines entre les mutants Y122A, W125A et R126A et SpNox WT.

4. Etude de l'interface entre les domaines TM et DH

A. Complémentarité des interfaces de contact

A partir de la structure résolue du domaine DH de SpNox_{DH} WT et du modèle d'homologie développé préalablement, une étude a été réalisée concernant l'assemblage de chacun des domaines de SpNox pour permettre le transfert d'électron du NADPH cytosolique aux hèmes transmembranaires. L'ancrage du modèle de TM sur la structure du DH révèle que la surface interne du TM apparaît particulièrement complémentaire à la forme bilobale du domaine déshydrogénase [8]

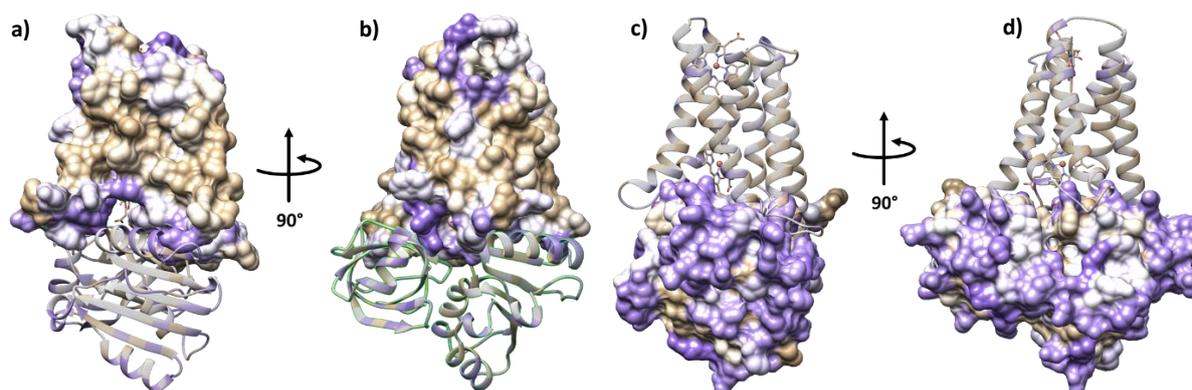


Fig.5.1.14 : Etude de la complémentarité des interfaces de contact entre les deux domaines de SpNox. Le modèle d'homologie du TM est ancré sur le domaine DH par alignement structural avec le cristal du domaine déshydrogénase SpNox_{DH} WT (a, b) Le modèle d'homologie du TM est représenté en surface et le DH en ruban. La structure est tournée de 90° selon l'axe vertical entre les deux vues. (c, d) La structure résolue du DH est représentée en surface et le TM en ruban. La structure est tournée de 90° selon l'axe vertical entre les deux vues. Les surfaces sont colorées en fonction de l'hydrophobicité des résidus, les résidus les plus polaires sont représentés en violet et les plus hydrophobes en orange.

B. Mécanismes possibles d'interactions entre les domaines de SpNox

Les conclusions des expériences de SANS mettent en évidence une grande flexibilité dans la région charnière entre les domaines de SpNox impliquant une grande mobilité du DH par rapport au domaine TM. Cependant, la réalisation du transfert efficace d'électrons à l'origine de la production de ROS implique l'existence d'une interaction transitoire entre les domaines TM et DH de SpNox lors du cycle catalytique de l'enzyme.

Ainsi, l'analyse des interfaces des régions transmembranaires et cytosoliques a été effectuée afin d'identifier le mécanisme permettant le rapprochement des deux régions. L'interaction entre les domaines de SpNox a été étudiée en représentant alternativement la surface de chacun des domaines, puis en observant, par vue du dessus l'interface en contact avec le second domaine. L'étude initiale a

été réalisée sur les profils d'hydrophobicité des surfaces (Fig.5.1.15) cependant, aucun patch hydrophobe potentiellement responsable de l'interaction des domaines n'a été identifié.

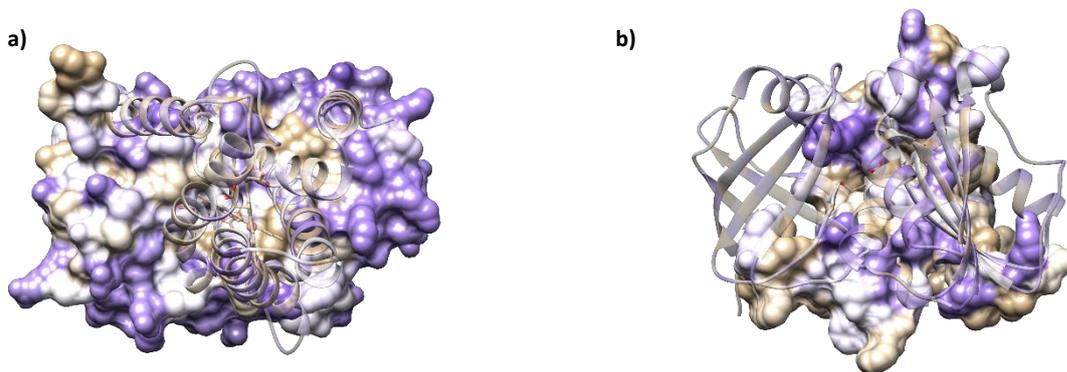


Fig.5.1.15 : Etude des interfaces des domaines TM et DH en fonction de l'hydrophobicité. (a) Le DH est représenté en surface tandis que le TM est représenté en ruban. La vue est prise du dessus de SpNox (TM en haut). (b) Le TM est représenté en surface tandis que le DH est représenté en ruban. La vue est prise du dessous de SpNox. Les surfaces et rubans sont colorés en fonction des l'hydrophobicité des résidus, les atomes les plus polaires sont représentés violets et les plus hydrophobes en orange.

L'interface entre les domaines TM et DH de SpNox a ensuite été analysée en fonctions du potentiel électrostatique de surface. L'observation des interfaces révèle ainsi la présence de trois sites de potentiel électrostatiques complémentaires entre la partie inférieure du TM et la partie supérieure du DH. En effet, le DH présente au niveau de sa partie supérieure deux régions électropositives (bleue) ainsi qu'une région électronégative (rouge) qui, dans le modèle généré pour cette étude, se trouvent à l'aplomb de régions complémentaires au niveau électrostatique présent sur la surface inférieure du domaine transmembranaire.

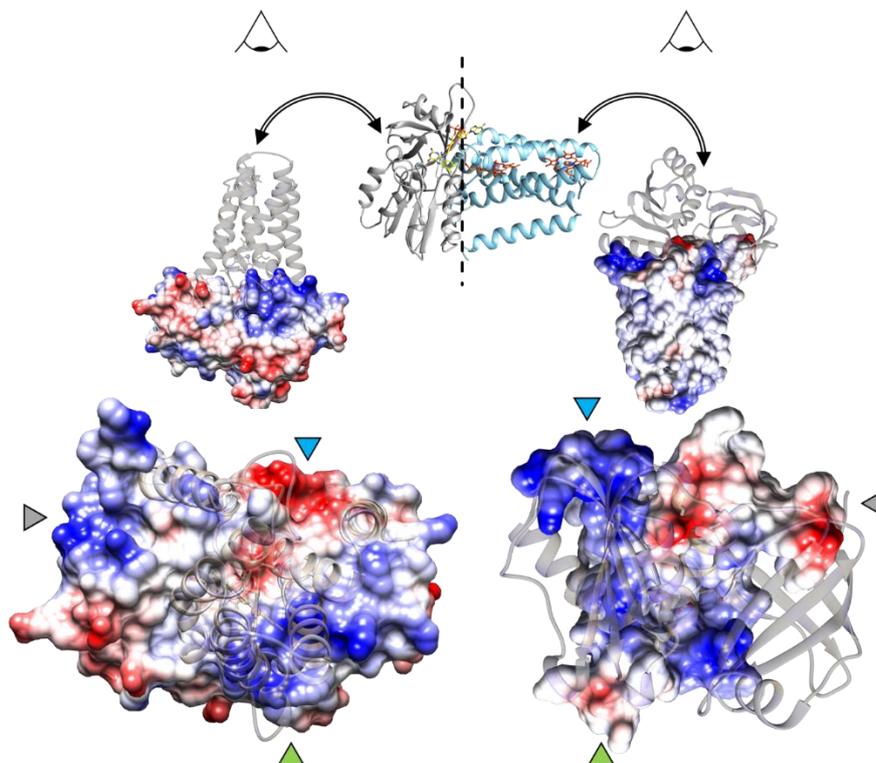


Fig.5.1.16 : Etude des interfaces des domaines TM et DH en fonction du potentiel électrostatique. (a) L'interaction entre les domaines de SpNox est étudiée en représentant alternativement chacun des domaines selon leur surface, sur laquelle a été projeté le potentiel électrostatique, puis en examinant, en vue du dessus ou du dessous, l'interface en contact avec le second domaine afin d'identifier des complémentarités de potentiel électrostatiques entre les 2 domaines. Les surfaces et rubans sont colorés en fonction des potentiels électrostatiques des résidus, les atomes les plus électronégatifs sont représentés en bleu et les plus électropositifs en rouge. Les triangles indiquent les régions complémentaires présentes sur les domaines TM et DH.

Ainsi, cette complémentarité électrostatique pourrait favoriser le positionnement optimal entre les deux domaines lors transfert d'électrons du DH vers le TM malgré la flexibilité importante de la région charnière. Cependant la surface correspondant au domaine TM étant issue d'un modèle, ces observations ne peuvent être qu'indicatives et doivent être considérées avec précaution. Seule une structure permettra de valider ces observations sur un possible mécanisme impliquant des interactions électrostatiques.

5. Conclusion

A travers la réalisation de caractérisations mécanistiques basées sur les données acquises à partir de la structure atomique de SpNox_{DH} WT et F397W, il a été possible de mettre en évidence l'existence d'interactions multiples entre SpNox et son cofacteur FAD à l'origine de mécanismes impliqués dans la régulation de la liaison du substrat NADPH au domaine déshydrogénase et dans l'amélioration significative de l'affinité de la protéine pour le FAD. Ces résultats démontrent ainsi l'importance de la résolution de la structure de SpNox pour la compréhension des détails enzymatique des NOX, transposables au protéines eucaryotes pour le développement de futurs traitement thérapeutiques.

1. Evaluation de la modularité de SpNox par cinétique spectrale

A. Tests préliminaires sur SpNox WT sous forme entière

Afin de caractériser la modularité de SpNox à travers une possible dynamique d'association entre les domaines de SpNox, une nouvelle approche, basée sur des cinétiques spectrales a été développée. Le principe de cette expérience consiste à suivre la consommation du substrat NADPH ainsi que la réduction des hèmes de la protéine lors de la catalyse du transfert d'électron, à travers la mesure au cours du temps des absorbances respectivement à 340nm, correspondant respectivement au maximum d'absorbance du NADPH, et à 430nm dont l'absorbance est attribuée à la réduction des hèmes au sein de la protéine. En absence de sélectivité de SpNox pour le NADPH ou NADH, les deux substrats peuvent être utilisés indifféremment avec la même affinité, et le NADH a ainsi été utilisé en tant que substrat dans cette étude. L'acquisition de spectres entre 300 et 600nm toutes les 12 secondes permet ainsi de suivre la réduction du pic à 340nm (Fig.5.2.1.a) correspondant à une consommation progressive du NADPH, ainsi que le décalage du pic de SpNox de 414nm à 430nm (Fig.5.2.1.b) relatif à la réduction progressive des hèmes de SpNox. Après consommation totale du NADH, la réoxydation des hèmes, caractérisée par la réapparition du pic à 414nm dont l'absorbance est attribuée à l'hème sous forme oxydée, peut être observée à partir de 24 secondes (tFAD+0.4min) après l'ajout de FAD et s'accompagne de la disparition progressive du pic à 430nm.

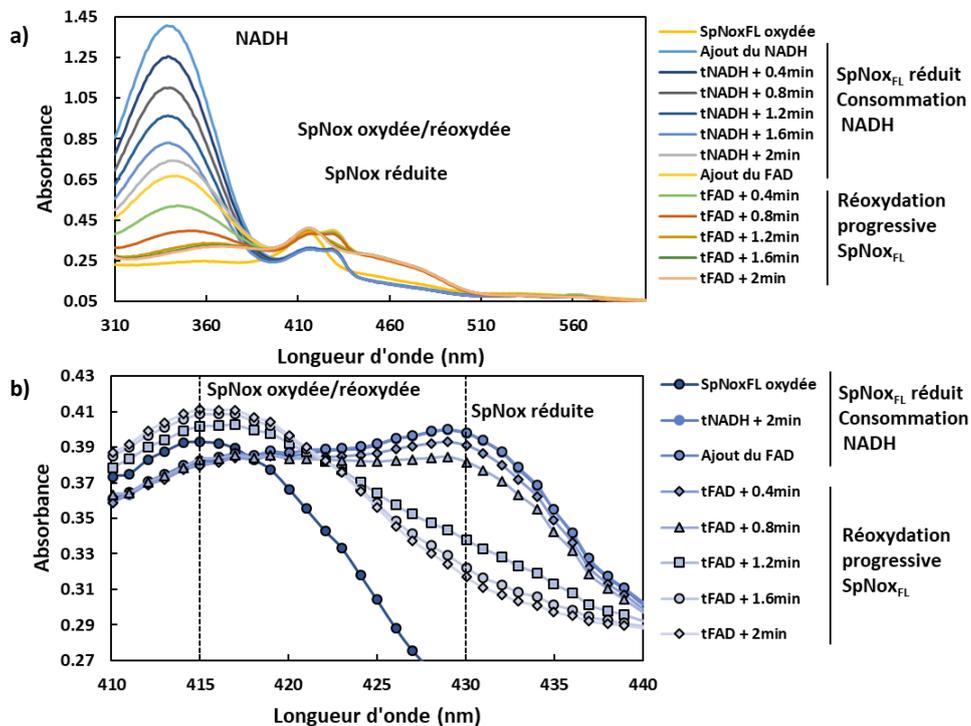


Fig.5.2.1 : Cinétique spectrale de la réduction de SpNox en présence de FAD et NADH. (a) Spectres d'absorbance entre 310nm et 600nm enregistrés toute les 12 secondes, Le premier spectre est réalisé sur SpNox_{FL} sous forme oxydée (SpNox_{FL} oxydée) tNADH ou tFAD dans la légende correspondent respectivement au temps auxquels le NADH et le FAD ont été ajouté au milieu réactionnel. (b) Détails des spectres d'absorbance entre 410nm et 440nm pour visualiser le décalage des pics correspondant à la réduction des hèmes. A tFAD+2min, les hèmes sont complètement réoxydés et le spectre présente un pic à 414nm Les pointillés indiquent la position théorique des pics d'absorbance correspondant respectivement aux hèmes sous forme oxydée (A_{414nm}) ou réduite (A_{430nm}).

La représentation des données, présentées selon d'unique longueurs d'ondes discrètes considérées au détriment d'un spectre continu, favorise une visualisation plus aisée en permettant le suivi de l'évolution des absorbances d'intérêts au cours du temps, respectivement 340nm, 414nm et 430nm.

Des tests préliminaires réalisés sur SpNox purifiée en présence de FAD (Fig.5.2.2.a) dans les tampons de purification ont montré qu'en absence d'addition supplémentaire de FAD dans le tampon réactionnel, l'ajout du NADH déclenche la réduction de l'absorbance à 340nm (consommation du substrat NADH), suggérant ainsi, à partir du FAD initialement présent lors de l'étape de purification, l'existence d'une rétention de la flavine suffisante par le domaine DH pour permettre la consommation du NADH, qui est entièrement consommé à partir de 225s, comme indiqué par la présence d'un plateau survenant après la décroissance de l'absorbance à 340nm.

En parallèle, le suivi de l'absorbance à 430nm, dont la valeur n'est pas modifiée par la présence de NADPH, permet l'évaluation spécifique de la réduction des hèmes de SpNox lors du transfert successif d'électrons, du NADPH au FAD puis aux groupement hémiques au sein du domaine TM de la protéine. L'efficacité de ce transfert est visualisée par l'augmentation subite de l'absorbance concomitante à l'ajout de NADH et suivie d'un plateau (40-150s) correspondant au maintien des groupement hémique à l'état réduit grâce au flux d'électron traversant l'enzyme. En revanche, l'ajout de FAD, en raison de propriétés d'absorption à cette longueur d'onde, conduit à un décalage du plateau initial à 430nm vers les valeurs hautes d'absorbance ($A_{430nm} \approx 0.6 \rightarrow A_{430nm} \approx 1.2$), cependant, le FAD étant en permanence régénéré, l'augmentation d'absorbance n'a pas d'incidence sur le suivi de la réduction des hèmes à cette longueur d'onde, comme l'indique l'allure inchangée du plateau d'absorbance à 430nm (150-230s), parallèle au plateau initial (50-150s) (Fig.5.2.2.a).

Lorsque le NADPH est entièrement consommé ($t=230s$), une décroissance de A_{430nm} pouvant correspondre à la réoxydation des hèmes est alors observée (Fig.5.2.2.b). Le suivi parallèle de l'absorbance à 414nm, correspondant aux hèmes oxydés, présente en fin de réaction ($t=230s$) une augmentation progressive, dont l'évolution est opposée à l'absorbance à 430nm, témoignant ainsi d'un retour du pic à 414nm au détriment du pic à 430nm, et démontrant alors qu'en absence de substrat NADPH, les hèmes passent de l'état réduit (A_{430nm}) à l'état oxydé (A_{414nm}). Ainsi, la décroissance observée à 430nm peut être attribuée à la réoxydation des hèmes de la protéine après consommation totale du NADH, par l'oxygène dissout en solution.

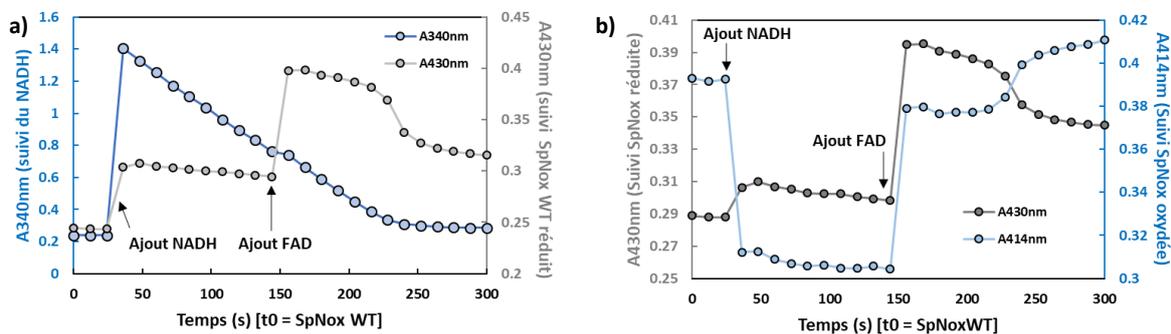


Fig.5.2.2 : Suivi de la consommation de NADH et de la réduction des hèmes de SpNox purifiée en présence de FAD. (a) Evolution des valeurs d'absorbances à 340nm (bleu) et 430nm (gris) permettant de suivre respectivement la consommation du NADH et la réduction des hèmes. (b) Suivi des valeurs d'absorbances à 430nm (gris) et 414nm (bleu) permettant de suivre respectivement la réduction, en parallèle de l'état d'oxydation des hèmes. Les flèches indiquent les temps auxquels ont été ajouté le NADH et le FAD.

Une nouvelle mesure a été réalisée sur SpNox issue d'une purification dont toutes les étapes ont été réalisées en absence de FAD. Le suivi de l'absorbance à 340nm, constituée d'un plateau (~20-200s), révèle ainsi que dans ces conditions, la consommation du NADH est dépendante de la présence du

FAD, et ne peut être déclenchée que lorsque le cofacteur est ajouté au mélange réactionnel (200s) contenant déjà le substrat, comme l'indique la décroissance à 340nm (200-350s) (Fig.5.2.3). La courbe d'absorbance à 430nm confirme, à travers l'augmentation abrupte de l'absorbance lors de l'ajout de FAD (~200s), que la réduction des hèmes au sein de la protéine ne se produit qu'en présence simultanée de NADH et FAD. Enfin, il est possible d'observer que la réoxydation de la protéine après consommation totale du NADH (~380s), traduite par la diminution d'absorbance à 430nm, ne permet pas un retour à la valeur initiale A_{430nm} (A_{430nm} initiale ~0.07, correspond à tous les hèmes sous forme oxydés) pouvant indiquer que sur le temps de la mesure, tous les hèmes en solution ne soient pas entièrement réoxydés, ou plus probablement en raison de l'augmentation d'absorbance liée à l'ajout du FAD en solution, qui ne permettrait alors plus le retour à la valeur d' A_{430nm} initiale).

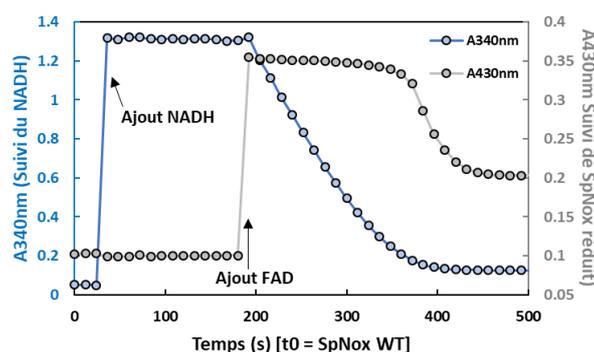


Fig.5.2.3 : Suivi de la consommation de NADH et de la réduction des hèmes de SpNox_{FL} purifiée en absence de FAD. (a) Evolution des valeurs d'absorbances à 340nm (bleu) et 430nm (gris) permettant de suivre respectivement la consommation du NADH et la réduction des hèmes. Les flèches indiquent respectivement les temps auxquels ont été ajoutés le NADH et le FAD.

B. Etude du transfert d'électrons du domaine DH vers le domaine TM

Afin de caractériser de possibles interactions entre les domaines TM et DH de la protéine, permettant d'assurer le transfert d'électron du DH vers le TM et donc l'activité enzymatique de SpNox, des expériences similaires ont été réalisées en présence d'un mélange équimolaire TM et DH. Pour cela, des contrôles négatifs préliminaires ont été réalisés sur le domaine DH seul de SpNox en présence ou non de FAD.

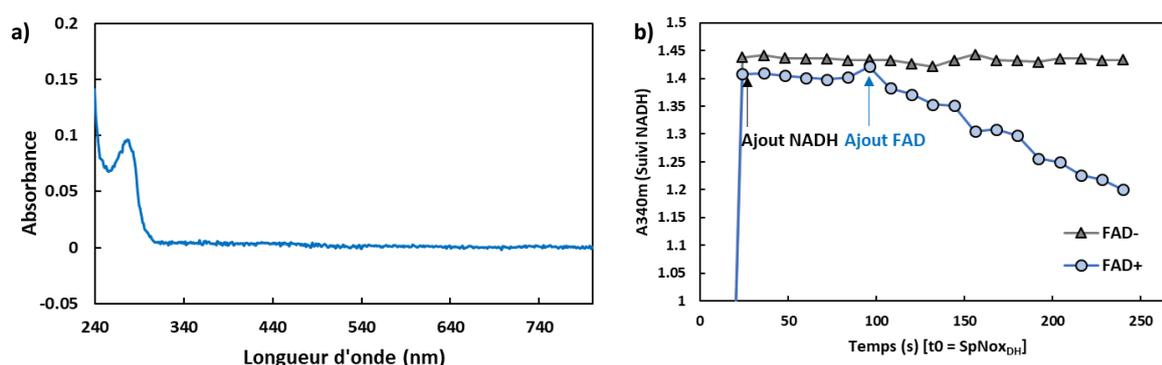


Fig.5.2.4 : Caractérisation spectrale et suivi cinétique sur le domaine DH isolé. (a) Spectre d'absorbance mesuré en présence de du domaine déshydrogénase DH seul montrant qu'il n'impacte pas les valeurs d'absorbance à 340 et 430nm. (b) Evolution des valeurs d'absorbances à 340nm permettant de suivre la consommation du NADH en présence de FAD (bleu) ou en absence de FAD (gris). La mention $[t_0=SpNox_{DH}]$ signifie que le domaine DH est présent dans le milieu réactionnel dès $t=0s$. Les flèches indiquent respectivement l'ajout de NADH et de FAD.

Le spectre correspondant à l'absorbance du domaine DH seul, montre l'absence de contribution du domaine DH à 430nm, en raison de l'absence d'hème au sein de ce domaine (Fig.5.2.4.a), ainsi l'absorbance indiquant la présence d'hèmes sous forme réduite (A_{430nm}) n'a pas été représentée lors

de ces mesures. Le suivi de l'absorbance à 340nm en fonction du temps (Fig.5.2.4.b) montre qu'après ajout de FAD, une consommation du NADH par le domaine DH seul (activité diaphorase) peut être observée à travers la décroissance de l'absorbance à 340nm, contrairement au test réalisé en absence de FAD dont A_{340nm} reste constante au cours du temps.

Ces contrôles démontrent qu'en présence de FAD, le domaine DH est capable de consommer le NADH indépendamment de la présence du domaine transmembranaire. En effet, comme le démontre la structure du DH résolue précédemment, le cofacteur, absence de TM, est largement accessible pour permettre une réoxydation par l' O_2 dissout.

Pour tenter d'évaluer la capacité du domaine DH à transférer les électrons au domaine TM lorsque les deux domaines de SpNox sont produits sous forme indépendantes, des suivis cinétiques ont été réalisés en ajoutant successivement à une solution contenant uniquement le domaine TM de SpNox, 20mM NADH, 10 μ M FAD et enfin le domaine DH.

Après ajout du domaine déshydrogénase (DH) au milieu réactionnel contenant le domaine TM, une décroissance drastique de l'absorbance à 340nm en fonction du temps témoigne de la consommation de NADH (Fig.5.2.5.a). En revanche, le domaine DH seul étant capable de consommer le NADPH en présence de FAD (Fig.5.2.4.b), cette observation n'est pas suffisante pour évaluer le degré d'implication du TM lors de cette consommation du NADH et il a été ainsi nécessaire de suivre l'état d'oxydoréduction du domaine TM à travers les valeurs d'absorbance à 414nm et 430nm.

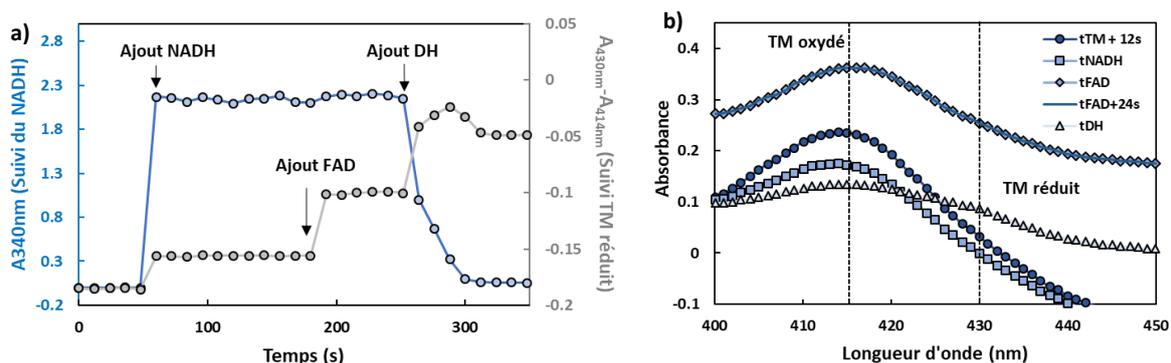


Fig.5.2.5 : Suivi de la consommation de NADH et de la réduction des hèmes dans un mélange équimolaire de TM+DH. (a) Evolution de la valeur d'absorbance à 340nm (bleu) et de l'absorbance différentielle $A_{430nm} - A_{414nm}$ (gris) permettant de suivre respectivement la consommation du NADH et la réduction des hèmes au sein du domaine TM. Les flèches indiquent les temps auxquels ont été ajoutés le NADH et le FAD, ainsi que le domaine DH (ajout DH) au mélange réactionnel contenant le domaine TM. (b) Spectres d'absorbance entre 400nm et 450nm enregistrés toutes les 12 secondes pour visualiser le décalage des pics de 414nm à 430nm correspondant à la réduction des hèmes. Pour faciliter la lecture, seuls les spectres mesurés à des temps spécifiques ont été représentés. Les pointillés indiquent la position théorique des pics d'absorbance des hèmes oxydés (414nm) et réduit (430nm). Les tTM, tNADH, tFAD et tDH de la légende correspondent respectivement au temps d'introduction du domaine TM, du NADH, du FAD et du domaine DH.

Ainsi les cinétiques spectrales (Fig.5.2.5.b) montrent que l'ajout du domaine DH conduit à une modification de la signature spectrale associée aux hèmes de la protéine avec une diminution de l'absorbance à 414nm accompagnée d'une augmentation à 430nm suggérant une réduction partielle du TM par le domaine DH alors que les deux domaines ne sont pas reliés au sein de la protéine entière.

En revanche l'introduction d'un grand volume de domaine DH (200 μ l) entraîne une importante dilution du milieu réactionnel, conduisant à la diminution globale de l'absorbance. Ainsi malgré le décalage du pic d'absorbance de 414nm à 430nm, les valeurs à 430nm après introduction du K181 sont plus faibles que les valeurs initiales et la réduction des hèmes n'est pas directement mesurable.

Afin de mettre en évidence l'éventuel décalage d'absorbance dû à la réduction des hèmes du domaine TM suite à l'ajout du domaine DH, une rationalisation différentielle ($A_{430nm}-A_{414nm}$) permettant d'amplifier la modification de spectre est réalisée. Ainsi, lorsque ce paramètre est représenté en parallèle du suivi d'absorbance (Fig.5.2.5.a, gris), l'augmentation de l'absorbance différentielle $A_{430nm}-A_{414nm}$, correspondant à la réduction partielle du TM peut être aisément visualisée simultanément à l'ajout du DH. De plus, la décroissance de l'absorbance différentielle survenant après consommation totale du NADH (~350s) peut être attribuée à la réoxydation des hèmes.

Afin de caractériser de manière plus approfondie la réduction des hèmes du domaine TM grâce au transfert d'électron entre les deux domaines indépendants de SpNox en solution, suggérant une interaction entre les deux domaines, l'expérience a ensuite été poursuivie à travers l'ajout d'un excès de NADH au milieu réactionnel (Fig.5.2.6.a).

Bien que l'ajout d'un trop grand excès de NADH conduise à la saturation du détecteur pour une longueur d'onde de 340nm et empêchant ainsi le suivi direct de la consommation du substrat à partir de A_{340nm} , cette supplémentation entraîne une forte augmentation des valeurs d'absorbance différentielle $A_{430nm}-A_{414nm}$ pouvant être interprétée par la réduction totale des hèmes du TM en accord avec les spectres mesurés en cours d'expérience, présentant un décalage du pic de 414nm à 430nm nettement visible après l'introduction du NADH en excès (Fig.5.2.6.b).

Ainsi malgré le fait que les domaines DH et TM soit découplés, l'ajout de NADH et de FAD semble permettre la réduction des hèmes du TM par transfert d'électrons depuis le NADH lié au sein du domaine déshydrogénase, mettant ainsi en évidence la modularité de la SpNox à travers l'interaction maintenue entre les deux domaines lorsqu'ils sont produits sous forme indépendante permettant ainsi le transfert d'électrons inter-domaines. L'analyse structure fonction ayant démontré l'existence d'interactions entre le cofacteur FAD et les deux domaines indépendants de SpNox, l'association des domaines TM et DH pourrait impliquer la participation du cofacteur FAD, en plus de potentielles interactions électrostatiques pour permettre le transfert d'électrons du DH vers le TM d'une manière similaire au transfert d'électron réalisé au sein de protéine sous forme entière.

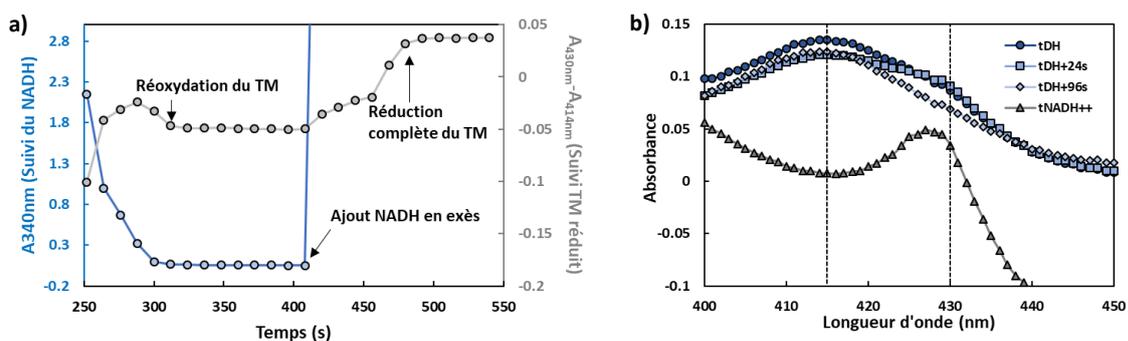


Fig.5.2.6 : Suivi de la réduction des hèmes dans un mélange équimolaire de TM+DH en présence d'un excès de NADH. (a) Evolution de la valeur d'absorbance à 340nm (bleu) et de l'absorbance différentielle $A_{430nm}-A_{414nm}$ permettant de suivre respectivement la consommation du NADH et la réduction des hèmes. Les flèches indiquent les temps auxquels ont été ajoutés le NADH, ou permettent de mettre en valeur les événements d'oxydation et réduction des hèmes au sein du domaine TM afin de faciliter l'interprétation. (b) Spectres d'absorbance entre 400nm et 450nm enregistrés toutes les 12 secondes pour visualiser le décalage des pics correspondant à la réduction des hèmes. Pour faciliter la lecture, seuls les spectres mesurés à des temps spécifiques ont été représentés. Les pointillés indiquent la position théorique des pics d'absorbance des hèmes oxydés (A_{414nm}) et réduit (A_{430nm}). Ces spectres sont réalisés dans la continuité de l'expérience précédente, ainsi le TM et DH sont déjà présents en solution. Les tDH et tNADH++ de la légende correspondent respectivement au temps d'introduction du DH et du NADH en excès.

Un contrôle négatif a finalement été effectué dans des conditions similaires au test précédent mais en absence de domaine DH (Fig.5.2.7). Les spectres acquis en cours d'expérience démontrent qu'en absence de domaine DH, l'ajout d'un excès de NADH et de FAD ne produit aucun décalage du pic

caractéristique des hèmes oxydés vers l'état réduit ($A_{414nm} \rightarrow A_{430nm}$) confirmant que le décalage du pic de 414nm à 430nm observé précédemment était lié à la réduction des hèmes par le transfert d'électron du DH au TM.

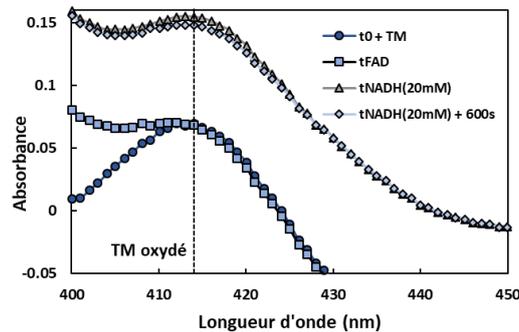


Fig.5.2.7 : Suivi de la réduction des hèmes en présence de TM seul. Spectres d'absorbance entre 400nm et 450nm enregistrés toutes les 12 secondes pour visualiser le décalage des pics correspondant à la réduction des hèmes. Pour faciliter la lecture, seuls les spectres mesurés à des temps spécifiques ont été représentés. Les pointillés indiquent la position théorique du pic d'absorbance des hèmes oxydés (A_{414nm}). Les t0+TM, tFAD et tNADH de la légende correspondent respectivement au temps d'introduction du domaine TM, du FAD et du NADH en excès.

C. Mesure d'affinité pour le NADH du système TM+DH

Dans le but de comparer les caractéristiques enzymatiques du complexe TM+DH avec celles de SpNox WT sous forme entière (SpNox FL), une mesure d'affinité pour le substrat NADH a été réalisée en suivant les vitesses de réduction du TM en fonction de la concentration de substrat. Il est ainsi possible d'observer une augmentation de la vitesse de réduction avec les concentrations croissantes du NADH (Fig.5.2.8.a) et la courbe des V_i en fonction de la concentration en substrat permet d'extraire un K_m du complexe TM+DH pour le NADH de $54\mu M$, 5 fois plus élevé que celui de SpNox WT et similaire au K_m du DH pour le NADH (Tab.5.2.1).

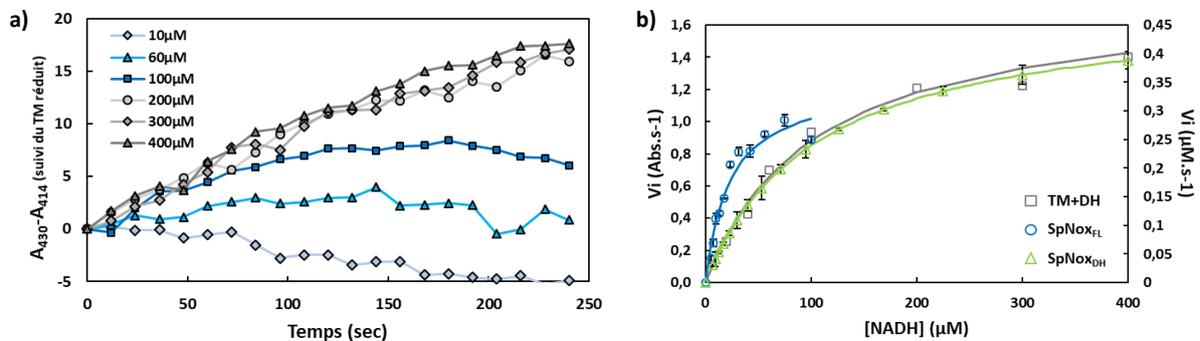


Fig.5.2.8 : Mesures d'affinité du système TM+DH pour le NADH. (a) Courbes de réduction des hèmes du TM en fonction de la concentration en NADH par suivi de l'évolution de l'absorbance différentielle $A_{430nm}-A_{414nm}$ représentative de la réduction du domaine TM. (b) Courbes de Michaelis et Menten obtenue pour le système TM+DH par cinétique spectrale exprimée en $Abs.s^{-1}$ et comparé aux courbes obtenues pour SpNox_{FL} et SpNox_{DH} par mesure d'activité cyt.C réductase et exprimées en $\mu M.s^{-1}$. Les courbes en trait plein représentent les ajustements obtenus à partir des K_m et V_m extraits des données expérimentales avec Prism.

Ainsi la réduction des hèmes du TM par le DH exprimé de manière indépendante semble équivalente en terme d'affinité pour le NADH à l'activité du DH seul (Fig.5.2.8.b), en revanche, ces mesures par suivie cinétique de la réduction des hèmes n'ont pas permis d'extraire de vitesse réactionnelle en mole de TM réduit par seconde pouvant être comparé aux vitesses réactionnelles des tests d'affinité.

	Système TM+DH	SpNox _{FL}	SpNox _{DH}
K_{mNADH} (μM)	105	41.78 ± 1.8	133.2 ± 3.3

Tab.5.2.1 : Valeurs des K_{mNADH} mesurées pour le système TM+DH, SpNox_{FL} et SpNox_{DH}.

En conclusion cette nouvelle approche a permis de mettre en évidence la fonctionnalité du système TM+DH pour le transfert des électrons du NADPH cytosolique aux groupements hémiques transmembranaires lorsque les domaines sont exprimés de manière isolée et indépendante démontrant ainsi la modularité de la protéine SpNox composé de deux domaines distincts et potentiellement indépendant.

2. Conception de Nox chimériques humanisées pour l'étude du transfert d'électron

A. Introduction

Un des obstacles majeurs au développement de médicaments ciblant spécifiquement les NOX réside dans le manque de données structurales et fonctionnelles principalement en raison de la difficulté à isoler ces enzymes sous forme active. L'activité de celles-ci est ainsi généralement évaluée à partir de cellules entières ou de membranes partiellement purifiées. Dans ces conditions, les efforts ont principalement été dirigés vers la caractérisation structurale et fonctionnelle d'homologues procaryotes de NOX, dont l'expression et la production en quantité suffisante est facilitée afin de réussir ces études complexes. Cependant, les débouchés et intérêts pharmaceutique encouragent à développer des stratégies permettant de caractériser les propriétés spécifiques des enzymes eucaryotes de cette famille, tel que les phénomènes d'activation et d'assemblages avec les facteurs de régulations. Ainsi une autre stratégie impliquant des chimères permettant ainsi d'associer les avantages de l'expression procaryote à l'étude fonctionnelle des NOX eucaryote a été envisagée.

Afin d'explorer les mécanismes de liaison des substrats et cofacteurs ainsi que les interactions intra et interprotéiques et le processus de transfert d'électrons des isoformes humaines de NOX, des chimères entre le domaine transmembranaire de SpNox et le domaine déshydrogénase de NOX humaines ont été élaborées. En effet, la présence du domaine transmembranaire de SpNox constituerait ainsi une plateforme d'expression adaptée aux paramètres physico-chimiques des membranes procaryotes afin de fournir une expression suffisante pour permettre, à travers la présence du domaine DH de NOX humaine, l'étude des mécanismes enzymatiques spécifiques d'isoformes de NOX eucaryotes, tels que l'interaction entre le facteur d'activation p67^{phox} et le domaine DH correspondant par exemple.

Les informations acquises grâce à cette stratégie pourraient permettre une caractérisation fonctionnelle avancée du mécanisme d'activation du transfert d'électron spécifiques aux isoformes eucaryotes. L'obtention de telles chimères de Nox procaryotes humanisées pourraient également être utilisées en tant que cribles préalables pour l'identification de molécules thérapeutiques potentielles afin de moduler spécifiquement l'activité de certaines isoformes de NOX.

Ainsi, ces chimères humanisées pourraient constituer des modèles satisfaisant des différentes isoformes de NOX qui pourraient être exprimées en quantité suffisante pour permettre des criblages étendus d'inhibiteurs ainsi qu'une caractérisation plus aboutie des NOX dans un objectif pharmaceutique.

B. Conception de chimères de 1^{ère} génération

En l'absence des données structurales haute résolution, l'établissement d'un alignement multiple de séquence de NOX eucaryotes et procaryotes avait notamment conduit, au cours du processus de création d'un modèle structural de SpNox, à l'identification d'une paire de résidus acide base hautement conservées parmi les homologues permettant ainsi d'identifier le résidu K181 comme le début du domaine déshydrogénase (Fig.5.2.9.a).

A partir de ces informations et afin de tenir compte d'incertitudes potentielles sur la prédiction des bornes interdomaines par l'approche bioinformatique, la création de différents types de chimères humanisées de NOX a ainsi été envisagée (Fig.5.2.9.b), en fusionnant respectivement les acides aminés M1-L178, ou M1-Q180 pour le domaine TM de SpNox, avec le domaine déshydrogénase correspondant respectivement à NOX2 ou NOX4, dont le début du domaine a également été défini à travers deux

bornes possibles, respectivement V286 ou F288 pour NOX2 ou Y300 ou Y302 pour NOX4. Le choix de la fusion avec le domaine DH NOX4, constitutivement active sous forme entière, permettrait ainsi de vérifier la validité de l'approche et de permettre une caractérisation facilitée de la fonctionnalité de la chimère, tandis que la chimère comportant le domaine DH NOX2 constituerait un support indispensable à l'étude approfondie de la mécanistique du transfert d'électron réalisé au sein de cette isoforme, notamment en permettant l'étude du mécanisme d'activation médié par l'interaction avec les facteurs cytosoliques au sein de NOX2.

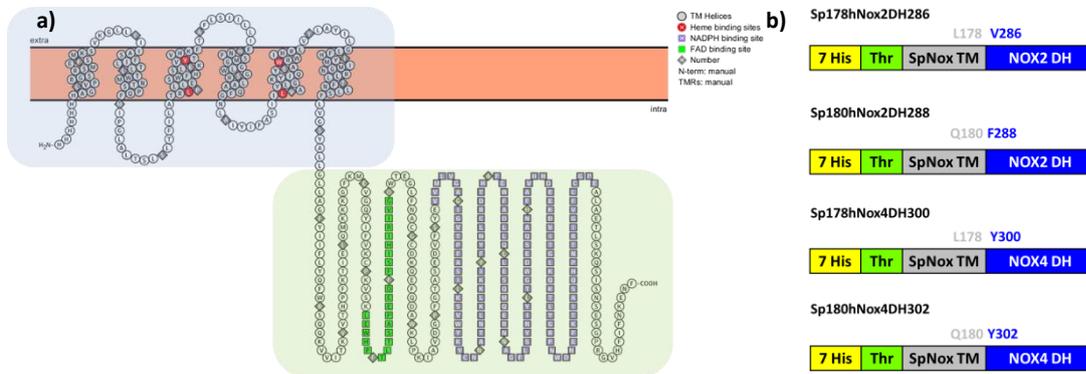


Fig.5.2.9 : Représentation schématique des chimères initiales. (a) Les chimères sont constituées du domaine TM de SpNox (bleu), pouvant être inséré facilement au sein des membranes procaryotes et constituant ainsi une plateforme d'expression bactérienne, ainsi que du domaine DH d'une isoforme de NOX eucaryote (NOX2 ou NOX4) (vert). Le domaine TM de SpNox (respectivement M1-L178 ou M1-Q180) est fusionné au domaine DH respectivement de NOX2 (V286-F570 ou F288-F570) ou NOX4 (Y300-S576 ou Y302-S576). La représentation de SpNox a été réalisée sous Protter [9]. (b) Schéma des chimères de 1^{ère} génération composé du domaine TM de SpNox et du DH de NOX2 ou NOX4. Pour chaque isoforme eucaryote deux versions de chimères sont conçues en stoppant respectivement le TM aux résidus L178 ou Q180.

Les spectres de différence, acquis sur les membranes issues de chaque type de chimère par soustraction du spectre d'absorbance de la protéine oxydée à la protéine réduite, présentent une signature spectrale avec deux pics respectivement à 426nm et 562nm, caractéristiques de la présence d'hèmes fonctionnels au sein des chimères (Fig.5.2.10).

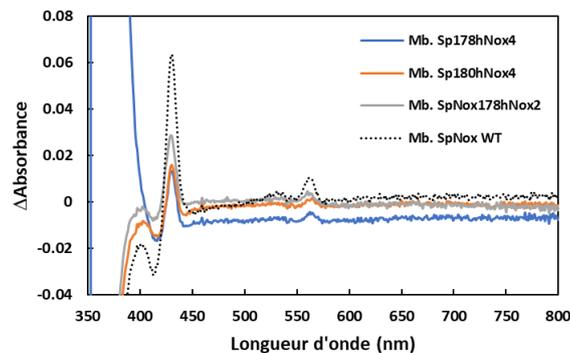


Fig.5.2.10 : Caractérisation spectrale des membranes de chimères SpNox-hNOX¹. Les spectres de différence sont acquis sur des membranes (0.1mg/ml) exprimant des chimères correspondant à la fusion du domaine transmembranaire TM de SpNox avec le domaine déshydrogénase (DH) respectivement de Nox2 (SpNox-NOX2) ou Nox 4 (SpNox-NOX4) par soustraction du spectre d'absorbance de la forme oxydée au spectre correspondant à la forme réduite. Les protéines au sein des membranes ont été réduites à l'aide de dithionite de sodium. Les deux pics observés à 426nm et 562nm correspondent à la signature spectrale des hèmes chélatés au sein des protéines membranaires.

Cette caractérisation suggère ainsi que les chimères, capables de chélater des groupements hémiques, peuvent être exprimées et enchâssées au sein des membranes de bactéries C41-DE3.

¹ hNOX désigne les isoformes NOX2 et NOX4 des NADPH oxydases existantes chez l'humain. NOX réfère aux NOX eucaryotes, tandis que Nox se rapporte aux homologues procaryotes de la NADPH oxydase.

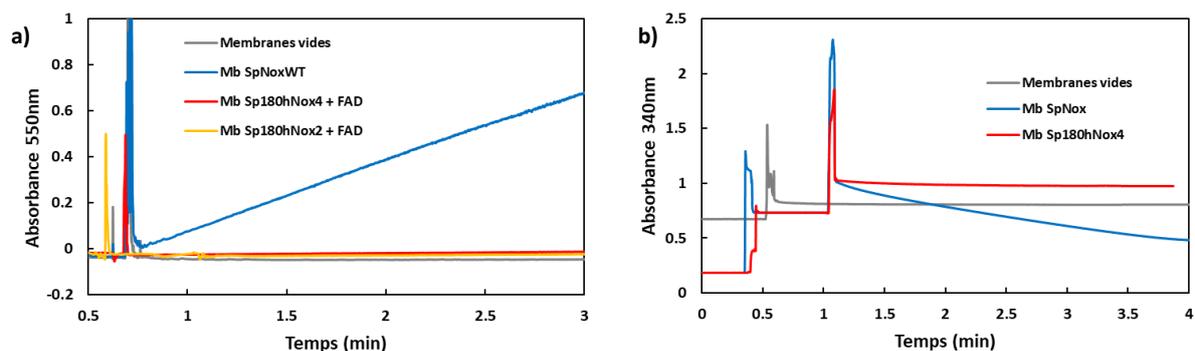


Fig.5.2.11 : Caractérisation fonctionnelle de membranes exprimant les chimères SpNox(TM)-hNOX(DH)² ou SpNox WT. L'activité cytochrome c est mesurée sur les membranes exprimant les chimères SpNox-hNOX4, SpNox-hNOX2 ou SpNox WT (a). Activité diaphorase mesurée sur les membranes exprimant les chimères SpNox-hNOX2 ou SpNox WT (b). L'activité cytochrome c réductase permet l'évaluation de l'efficacité du transfert d'électron dans son intégralité, du NADPH cytosolique au FAD puis aux hèmes successifs pour réduire l'oxygène moléculaire conduisant à la formation d'anions superoxydes conduisant à la réduction du cytochrome c tandis que l'activité diaphorase correspond au transfert d'électrons entre le substrat NADPH et le cofacteur FAD, évalué par la réduction du NADPH suivi à 340nm.

L'activité cytochrome c réductase des membranes exprimant les chimères a également été évaluée (Fig.5.2.11.a), mais présente pour toutes les chimères caractérisées une pente nulle par rapport aux membranes exprimant SpNox WT, témoignant de l'absence d'activité mesurable et suggérant que malgré le contenu en hème enrichi au sein des chimères par rapport à des membranes vides, le transfert d'électron ne peut pas être réalisé efficacement le long de la chaîne catalytique du NADPH à l'O₂ pour former l'anion superoxyde capable de réduire le cytochrome c. Le mécanisme de transfert d'électrons au sein des NOX eucaryotes nécessitant probablement l'interaction entre les domaines DH et TM, l'absence d'activité cytochrome c réductase pourrait résulter d'une incapacité des chimères à effectuer cette interaction entre le domaine DH eucaryote et le domaine TM procaryote, dont les boucles, plus courtes, ne sont pas adaptées à une interaction spécifique avec le DH de NOX2 ou NOX4. Ainsi, l'efficacité du transfert d'électron a également été estimée, plus particulièrement au sein du domaine déshydrogénase uniquement, grâce à l'évaluation de l'activité NADPH oxydase. De même, aucune des chimères n'a présenté d'activité diaphorase (Fig.5.2.11.b), correspondant au transfert d'électrons uniquement dans la région du domaine DH, du substrat NADPH au cofacteur FAD. De plus, bien que tous les tests d'activité aient été réalisés en absence des facteurs cytosoliques (notamment p67^{phox} et la petite GTPase Rac), essentiel pour NOX2, l'activité de NOX4 est constitutive [10] et une chimère fonctionnelle ne devrait donc pas être impactée par l'absence de ceux-ci. L'absence d'activité des chimères suggère ainsi un manque d'intégrité, probablement au niveau du domaine déshydrogénase des NOXs eucaryotes qui pourrait éventuellement nécessiter une stabilisation normalement apportée par le domaine transmembranaire des NOXs correspondantes, remplacé dans les chimères par le TM de SpNox, dont les boucles plus courtes ou de séquence trop divergente par rapport aux NOX ne seraient pas suffisantes pour permettre une interaction productive.

Cependant un processus similaire à celui utilisé pour SpNox WT a été appliqué pour la purification des deux types de chimères SpNox-hNOX4.

² SpNox(TM)-hNOX(DH) est utilisé pour désigner une chimère entre le domaine transmembranaire TM de SpNox fusionné avec le domaine DH d'une chimère eucaryote hNOX2 ou hNOX4.

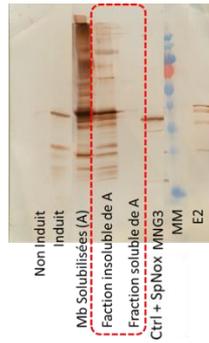


Fig.5.2.12 : Caractérisation du résultat de purification de la chimère SpNox-hNOX4 par Western Blot

Afin de comprendre l'absence de protéines dans les fractions de purifications, une expérience de fractionnement a été réalisée sur les chimères en utilisant SpNox WT comme référence. Ce processus permet notamment, au cours de multiples étapes successives, d'isoler respectivement les protéines solubles, les protéines associées aux membranes, les protéines membranaires, les corps d'inclusion ou les fractions demeurant insolubles quel que soit le traitement appliqué.

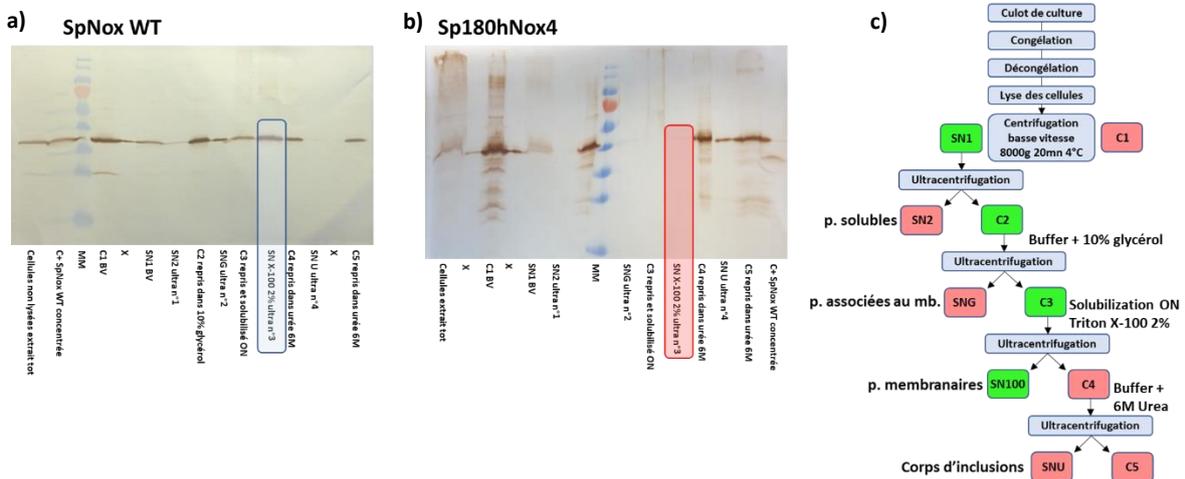


Fig.5.2.13 : Localisation subcellulaire des chimères SpNox-hNOX4 ou SpNox. Western blot représentatif des fractions de purification des chimères SpNox-hNOX4 (a). Western Blot de toutes les étapes de purification, le lysat cellulaire est centrifugé afin d'isoler les protéines solubles (SN2) puis le culot est resuspendu dans un tampon contenant du glycérol (C2) afin d'isoler les protéines associées aux membranes (SNG), puis le culot C3 est resuspendu dans un tampon supplémenté de 2% Triton X-100 avant solubilisation pendant 16h (SN100). C4 est resuspendu dans l'urée pour solubiliser les corps d'inclusions (SNU). C5 contient les protéines qui n'ont pu être solubilisée par aucune des étapes préalables (b). Le western blot obtenu pour SpNox-hNOX4 est représentatif des quatre versions de chimère, avec une absence de protéines solubilisées dans la fraction SN100, au sein de laquelle sont attendues les protéines membranaires solubilisées par le détergent.

Les résultats ont montré que contrairement à SpNox qui peut être solubilisée avec succès avec un tampon comportant un détergent (2% de Triton X-100), les chimères sont majoritairement localisées dans les fractions ne pouvant être solubilisées à l'aide de détergent ou d'urée, indiquant que bien que les protéines soient probablement exprimées à la membrane, l'enchâssement des chimères au sein des membranes pourrait ne pas être optimal, et ne pas permettre la solubilisation de ces protéines membranaires artificielles.

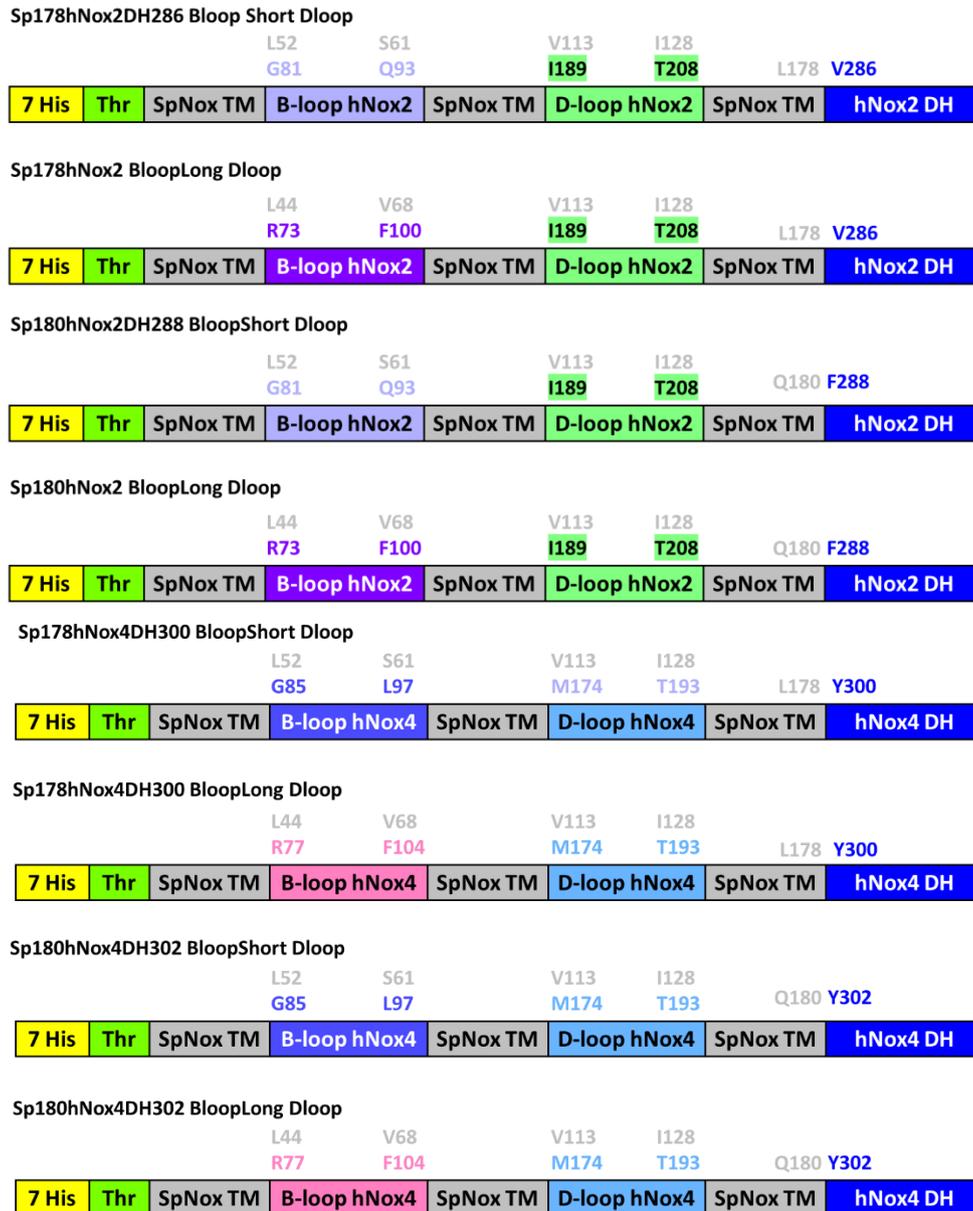


Fig.5.2.14 : Représentation schématique des constructions correspondant à la seconde génération de chimères SpNox-hNOX. Les chimères sont constituées du domaine TM de SpNox, dont les boucles B et D, ont été substituées par une version courte ou longue des boucles B et D correspondante à une isoforme de NOX (NOX2 ou NOX4), ainsi que du domaine DH de la même isoforme de NOX eucaryote. Le domaine TM de SpNox (respectivement M1-L178 ou M1-Q180) est fusionné au domaine DH respectivement de NOX2 (V286-F570 ou F288-F570) ou NOX4 (Y300-S576 ou Y302-S576). Les acides aminés de SpNox substitués lors de l'incorporation des boucles eucaryotes sont indiqués en gris.

L'élaboration d'une version préliminaire n'a pas permis de définir un choix plus précis concernant les limites respectivement des domaines TM ou DH. Cependant, afin d'explorer de manière plus approfondie si la substitution des boucles du TM de SpNox correspondant aux boucles B et D respectivement des domaines transmembranaires NOX2 ou NOX4, supposées impliquées dans l'interaction avec les domaines DH correspondants, pourraient permettre l'obtention de chimères humanisées fonctionnelles, de nouvelles constructions ont été générées à partir des premières générations de chimères.

Sur la base d'alignement de séquences eucaryotes et procaryotes, ainsi que d'outils de prédiction de la topologie de SpNox au sein de la membrane, et de modèles d'homologies de SpNox, NOX2 et NOX4, les boucles de B et D de SpNox ont ainsi été remplacées par mutagenèse dirigée par les boucles des

deux isoformes de NOX, conduisant ainsi à la création de huit constructions chimériques supplémentaires. Cette stratégie, en présentant les boucles cytosoliques dans le domaine TM complémentaire au DH des NOX correspondante, fournirait ainsi une version humanisée plus proche des isoformes réelles et pourrait ainsi permettre de conserver la fonctionnalité de l'enzyme.

Dans le cadre de la collaboration mise en place pour ce projet de thèse, les chimères ont été produites puis envoyées pour caractérisation dans le laboratoire du Pr. Smith à Kennesaw. Parmi celle-ci, la chimère (pET30b-His-SpNoxTm[BLoopShort NOX2 Sp178hNox2DH286 Bloop Short Dloop] TM1-178 de SpNox dont les boucles B et D ont été substituées respectivement par la version courte de la boucle B de NOX2 et la boucle D de NOX2 ainsi que le domaine DH de NOX2 (V286-F570) a pu être exprimée, solubilisée et purifiée avec succès.

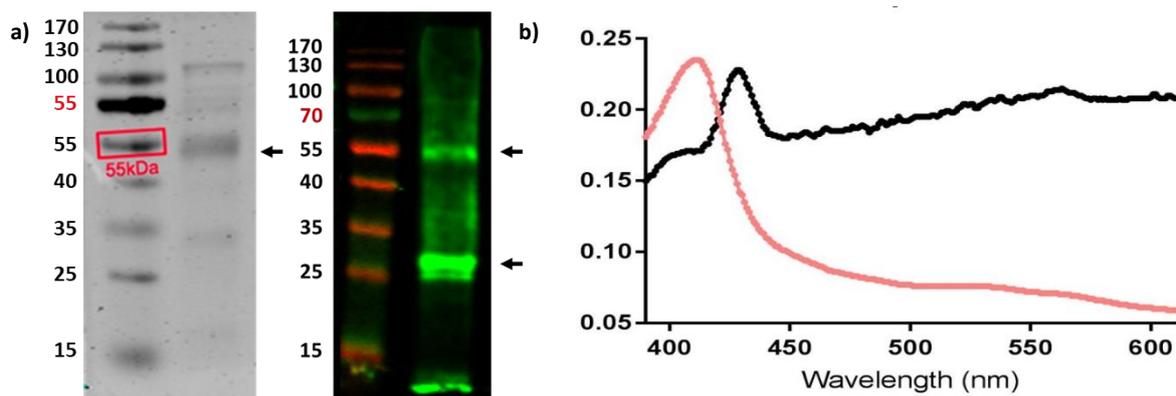


Fig.5.2.15 : Caractérisation biochimique de la chimère SpNox-hNOX. (a) La migration sur gel d'acrylamide 12% (SDS-PAGE) après chromatographie d'exclusion de taille indique la présence d'une bande à 55kDa correspondant à la chimère Sp178hNox2DH286 Bloop Short Dloop. Le western-blot indique le marquage par les anticorps dirigés contre l'étiquette polyhistidine confirme la présence de la chimère (flèche) sous forme non clivée (55kDa) et montre l'existence d'une forme clivée, majoritaire, correspondant au domaine TM humanisé uniquement (23kDa). (b) Les spectres oxydé (rouge) et le spectre de différence (noir), obtenu par soustraction du spectre d'absorbance de la forme oxydée à la forme réduite, sont acquis pour une fraction purifiée de la chimère (2mg/ml) présente la signature spectrale caractéristique des hèmes suggérant un repliement fonctionnel du domaine TM de la chimère humanisée. Les deux pics observés à 426nm et 562nm correspondent à la signature spectrale des hèmes de type b chélatés au sein des NOX membranaires. Les protéines au sein des membranes ont été réduites à l'aide de dithionite de sodium.

La migration sur gel d'acrylamide, réalisée à l'issue de la chromatographie d'exclusion de taille, révèle la présence d'une bande à la taille attendue (56kDa) correspondant probablement à la protéine chimérique ainsi que de bandes mineures correspondant probablement à des contaminants. Cependant, la présence de deux bandes, respectivement à 55kDa et 25kDa, majoritaire, suggère un clivage de la protéine, probablement au niveau de la région charnière entre le TM de SpNox (23kDa) et le domaine DH de NOX2 (33kDa). La reconnaissance par l'anticorps de l'étiquette polyhistidine présente en N-ter de la protéine indique que la bande de poids moléculaire inférieur correspond probablement au domaine TM humanisé de SpNox. La caractérisation spectrale des fractions issues de la chromatographie présente un pic à environ 414nm sur le spectre oxydé ainsi qu'un pic à 426nm sur le spectre de différence permettant de confirmer la présence d'hèmes au sein de ces fractions, suggérant que le TM, bien que tronqué, semble conserver un repliement permettant la chélation des hèmes. En revanche, la caractérisation enzymatique, bien que réalisée en présence de p67^{phox} et Rac ne s'est pas révélée concluante.

Ainsi, alors que les protéines chimériques initiales demeuraient non extractibles hors de la membrane, le développement de cette nouvelle génération de chimère plus évoluées, en incluant aux constructions préliminaires les boucles de NOX eucaryotes au sein du TM de SpNox, afin de permettre une éventuelle interaction avec le domaine DH des NOX, a donc conduit à une amélioration encourageante. Les résultats obtenus suggèrent cependant que la définition des boucles devra encore

être adaptée pour permettre d'accéder favorablement à un projet aussi ambitieux que la production de protéines SpNox-hNOX chimériques fonctionnelles. De plus, cette approche, bien qu'exploratoire, souligne que malgré les conclusions apportées par l'étude SANS et conforté par les mesures d'activité réalisé sur le système TM+DH indépendants, indiquant que les domaines TM et DH de SpNox semblent constituer des domaines distincts et indépendants, nécessité d'une spécificité ainsi qu'une complémentarité entre les domaines respectifs pour permettre une activation de la protéine.

Ce travail exploratoire n'a pas pu être poursuivi plus loin que ces premières expériences/constructions initiales dans le cadre de cette thèse compte tenu des autres axes de travail déjà très prenants. Mais, compte tenu de l'impact potentiel en termes d'applications mais aussi d'études fondamentales, ces approches d'ingénierie de NOX chimériques seront poursuivies et examinés plus en profondeur par le laboratoire après mon départ.

Ouvertures et Conclusion

Structure basse résolution de SpNox et
conclusion générale

VI

1

Résolution de la structure cristallographique basse résolution de SpNox sous forme entière

La stratégie consistant à résoudre de manière indépendante de résolution les domaines de SpNox a permis d'obtenir la structure haute résolution du domaine DH de la protéine. En revanche, aucun cristal de TM n'a présenté de diffraction suffisante pour permettre la résolution de la structure de ce domaine. De plus, les limites d'une telle approche ont été démontrées avec CsNox, à travers l'existence de conflits stériques lors de la construction d'un modèle de la protéine sous forme entière par ancrage de chacun des domaines celle-ci, respectivement résolus indépendamment. La résolution de SpNox sous forme entière constituerait donc une avancée majeure pour la compréhension de la mécanistique enzymatique des NADPH oxydases. Ainsi, malgré les contraintes liées à une qualité de diffraction non optimale des cristaux de SpNox sous forme entière, une stratégie adaptée a été envisagée pour permettre l'exploitation selon les meilleures limites de résolutions des données collectées afin d'établir une première solution de la structure de la protéine sous forme entière.

1. Mise en évidence de l'anisotropie des cristaux de SpNox sous forme entière

L'anisotropie de diffraction correspond à la propriété des cristaux à présenter une qualité de diffraction dépendante de la direction du faisceau des rayons X réémis suggérant ainsi une asymétrie des paramètres physiques au sein des cristaux selon les différents axes. Expérimentalement, cette anisotropie se traduit sur les données de diffractions par une diminution plus rapide de l'intensité de diffraction dans certaines directions par rapport à la réduction systématique d'intensité observée généralement pour les plus hautes résolutions [1]. Dans ces conditions, la distribution des intensités de diffraction anisotropes ne se fait plus de manière homogène à l'intérieur de sphères de résolution en fonction des angles de diffusion mais peut être décrite par des ellipsoïdes en fonction des angles de diffusion.

A. Observation de l'anisotropie des cristaux de SpNox

L'analyse des clichés de diffraction obtenus pour différentes orientations du cristal par rapport au rayon X incident met en évidence une forte dépendance directionnelle de la limite de diffraction pour la plupart des cristaux de SpNox testés (Fig.6.1.a), caractérisée par une limite de résolution oscillant entre 4Å et 8Å en fonction de l'orientation du cristal. Les clichés présentant les meilleures limites de résolution montrent ainsi que le cristal diffracte à une résolution plus élevée selon l'axe *c*. De plus, les courbes de résolution en fonction de l'angle montrent que la période d'oscillation entre les hautes et basses résolutions est de 180° (Fig.6.1.b) témoignant de l'existence d'une asymétrie dans l'empilement cristallin selon les différentes directions des paramètres de maille *a*, *b* et *c*.

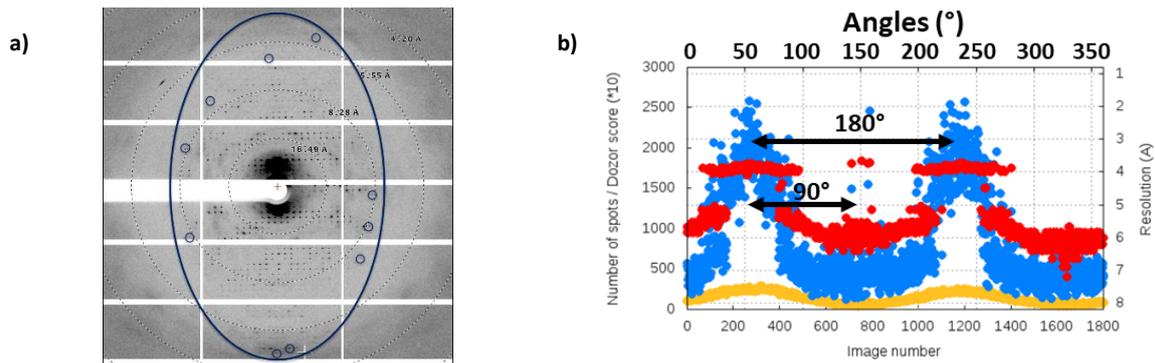


Fig.6.1.1 : Observation de l'anisotropie de diffraction des cristaux de SpNox. (a) Cliché de diffraction obtenu pour un cristal SpNox WT sous forme entière présentant une limite de résolution à 4.2Å. Les tâches de diffraction maximales visibles dans les différentes directions sont entourées en bleu, mettant en évidence l'anisotropie de diffraction du cristal. (b) Suivi de la résolution et du nombre de tâches mesurées en fonction de l'angle du cristal. Nombre de tâches de diffraction (jaune), score Dozor (bleu), résolution (rouge).

B. Origine de l'anisotropie de diffraction au sein des cristaux

En accord avec la loi de Bragg, chaque orientation du cristal permet de placer en conditions de diffraction différentes familles de plans. Ainsi, une dépendance de la limite de résolution en fonction de l'angle d'incidence telle que celle observée avec SpNox, révèle l'existence d'une inhomogénéité de qualité des différents plans hkl des cristaux. Malgré le manque de données bibliographiques sur l'origine de l'anisotropie de diffraction dans les cristaux de protéines, il est généralement admis qu'un nombre réduit de contacts cristallins dans le réseau dans des directions spécifiques de l'espace pourrait être à l'origine de cette dépendance directionnelle. En effet, l'étude structurale de la protéine OmpF [2], cristallisée sous forme trimériques dans le groupe d'espace C121 révèlent une forte anisotropie de diffraction, caractérisée par une perte de qualité de diffraction suivant les directions k et h du réseau réciproque. L'arrangement des trimères de OmpF dans la structure cristalline montre clairement que la majorité des contacts interprotéiques au sein du cristal sont réalisées le long de l'axe c du cristal, tandis que les contacts suivant les directions a et b sont véhiculés par les bouées de détergents et donc plus faibles, pouvant ainsi apporter une explication à l'anisotropie de diffraction couramment observée au sein des cristaux de protéines membranaires.

Les directions k et h du réseau réciproque correspondant globalement aux vecteurs \vec{a} et \vec{b} de la maille, la dégradation de la qualité de diffraction des cristaux de SpNox selon ces directions pourrait ainsi être liée aux faibles contacts cristallins s'établissant entre les ceintures de détergent.

D'autres travaux semblent également montrer une corrélation entre l'observation d'une forte anisotropie de diffraction et la présence de mauvais contacts au sein des cristaux [3, 4].

Une étude systématique de l'anisotropie de diffraction a été menée à l'aide de facteurs de structure expérimentaux disponibles dans la banque de données sur les protéines (PDB) et révèle que les protéines membranaires présentent un comportement associé à la diffraction des rayons X différent de celui observé pour des protéines solubles, avec notamment un niveau d'anisotropie systématiquement plus élevé au sein des protéines membranaires [5]. L'analyse de l'évolution de l'anisotropie en fonction de la résolution finale atteinte suggère qu'un manque de contacts cristallins est globalement corrélé à une anisotropie élevée, bien qu'une fraction des cristaux analysés présente une limite de diffraction élevée associée à une anisotropie significative. Ce travail montre également qu'il ne semble pas exister de différence statistique entre les différentes classes de protéines membranaires (canaux, récepteurs, transporteurs, etc.), et que la présence ou l'absence de domaines extra-membranaires au sein de la

protéine, ainsi que le type de cristallisation (en détergent ou *in-meso*) utilisé ne semble pas exercer d'influence sur l'anisotropie, malgré un nombre supérieur de contacts cristallins observés par cristallisation en phase cubique (*in meso*).

C. Impact de l'anisotropie sur le traitement des jeux de données

Les programmes de traitement de données classiques tels que REFMAC nécessitent de définir, préalablement au traitement des données, une limite de résolution pour l'ensemble du jeu de données, imposant ainsi à l'ensemble des clichés de diffraction une limite circulaire à la résolution choisie, au sein de laquelle les réflexions seront incluses pour le traitement des données. Ainsi, dans le cas d'une diffraction anisotrope, cette limite circulaire implique alors, si la limite est choisie selon l'axe des résolutions les plus basses, l'exclusion des meilleures résolutions. Au contraire, l'inclusion des réflexions selon l'axe de plus haute résolution pour le traitement des données entraîne intrinsèquement l'inclusion de réflexions absentes dans les directions de basse diffraction, conduisant alors à une diminution significative du ratio signal/bruit (I/σ).

L'anisotropie de diffraction peut également conduire, malgré une limite de résolution élevée [3], à un manque de détail sur la carte des densités électroniques et une dégradation importante du facteur R en raison des algorithmes de mise à l'échelle automatiquement appliqués par les logiciels. En effet, lors de cette étape, les amplitudes associées aux réflexions selon la direction présentant une faible diffraction est augmentée, au détriment des réflexions selon la direction de plus haute diffraction, dont les amplitudes sont réduites de telle sorte que la contribution de celles-ci au sein de la carte de densité électronique soit très faible, engendrant alors un manque de détails sur la carte.

2. Résolution de la structure cristallographique basse résolution de SpNox

A. Traitements des jeux de données anisotropes du serveur STARANISO

a. Présentation des serveurs

Afin d'adapter les méthodes de traitements des données aux contraintes imposées par les cristaux présentant une forte anisotropie de diffraction, des serveurs dédiés tels que STARANISO [6] ou Anisoscale [3] ont été développés.

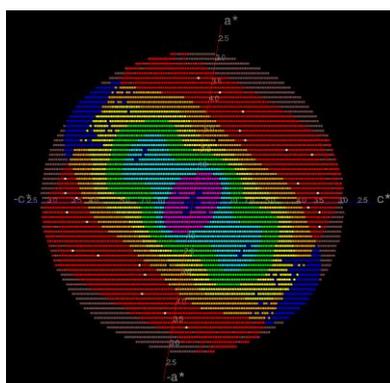


Fig.6.1.2 : Traitement elliptique des données de diffraction anisotropes par STARANISO. Exemple de cliché de diffraction où la valeur moyenne locale de $I/\sigma(I)$ est représentée par un point de couleur pour chaque réflexion. Les zones contenant les tâches de diffraction non mesurées sont représentées en noir. Les réflexions représentées en rose, correspondant aux très basses résolutions, sont non attendues, en raison de la présence de l'ombre du beam stop sur le détecteur mais présentes, tandis que les réflexions en bleus correspondent à des réflexions attendues mais absentes. En effet, la majorité de ces tâches sont tronquées par les bords du détecteur dans les quadrants supérieurs gauches et inférieurs droits. Concernant les réflexions mesurées, les points rouges représentent des données non observées avec leur moyenne locale $I/\sigma(I)$ en dessous du seuil de coupure de 1.2, correspondant au bruit de fond. Les autres couleurs pour les réflexions visibles et attendues sont représentées selon une échelle de couleur de cyan à rouge, du plus intense vers le moins intense. L'anisotropie des données est observable selon des directions $[-1,0,1]$, $[0,1,0]$ et $[1,0,1]$. STARANISO tronque uniquement les régions rouges.

La principale caractéristique de ces outils consiste à remplacer la limite de résolution circulaire classique par une limite de résolution elliptique permettant ainsi, lors du traitement des données, de prendre en compte les réflexions de plus haute résolution tout en excluant les faibles réflexions présentes sur les axes de basse résolution. De plus, une mise à l'échelle anisotrope peut également être réalisée sur les données afin d'éviter la perte de détail, apportés par les réflexions de plus haute résolution, au sein des cartes de densité électronique. Ces serveurs permettent ainsi d'exploiter le maximum d'informations disponibles pour les plus hautes résolutions malgré la présence d'anisotropie de diffraction au sein des cristaux de protéines.

b. Traitement des jeux de données

Afin de tenter de résoudre la structure de SpNox sous forme entière, les meilleurs jeux de données obtenus sur le mutant SpNox F397W ont été analysés avec le serveur STARANISO avec l'aide précieuse de Vincent Chaptal de l'institut de Biologie et Chimie des Protéines à Lyon, qui a développé, à travers la résolution de la structure de OmpF [2], une expertise pour l'étude de données des diffractions complexes, présentant généralement une anisotropie associée à une faible diffraction. Le résultat de ces analyses effectuées avec STARANISO conduit aux fichiers habituels de traitement des données de diffraction et fournit également le détail des limites de résolution mesurées dans chacune des directions de l'espace.

Afin de déterminer les orientations des cristaux de SpNox présentant les meilleures résolutions, les limites de résolution suivant les trois directions de la maille des cristaux de SpNox F397W et F397S analysés par le serveur STARANISO ont été étudiées, démontrant que la limite de résolution est systématiquement optimale suivant le vecteur *c*, c'est-à-dire selon les plans perpendiculaires à la hauteur des cristaux. Ces observations semblent ainsi suggérer la présence de contacts cristallins de meilleure qualité parallèlement à la base hexagonale des cristaux que suivant leur hauteur ou pourrait témoigner de l'existence d'un certain désordre pouvant résulter d'une hétérogénéité ou d'une fragilité au sein des cristaux selon cette direction, fournissant ainsi des indications sur d'éventuelles paramètres à explorer pour permettre l'amélioration de la qualité de la croissance et de la diffraction des cristaux de SpNox.

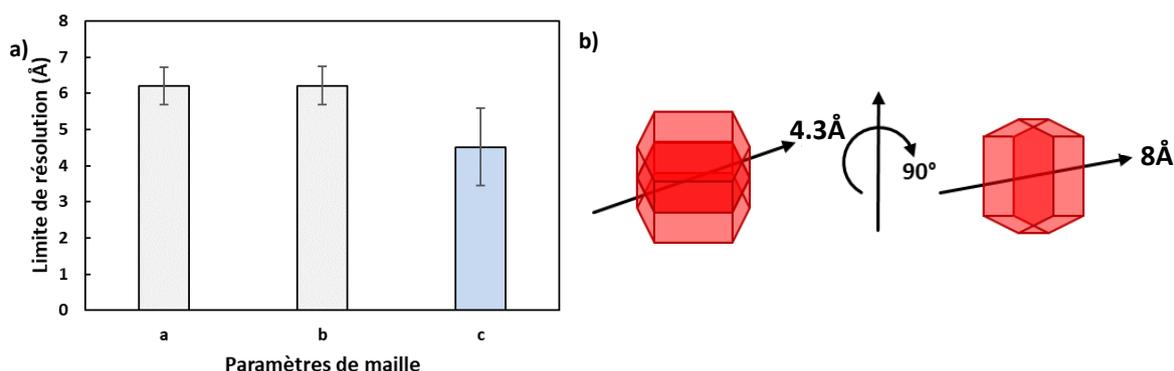


Fig.6.1.3 : Limite de résolution anisotrope des cristaux de SpNox_{FL}. (a) Histogramme des résolutions mesurées suivant les axes *a*, *b* et *c* de SpNox suite aux traitements de jeux de données avec STARANISO. (b) Schéma de diffraction anisotrope des cristaux de SpNox.

Le traitement des jeux de données obtenus sur SpNox sous forme entière par STARANISO a également permis de mettre en évidence cinq cristaux, obtenus avec le mutant SpNox_{FL} F397W, présentant une limite de résolution dans la direction de haute résolution comprise entre 3 Å et 3.4 Å qui pourrait éventuellement permettre de résoudre la structure de SpNox sous forme entière.

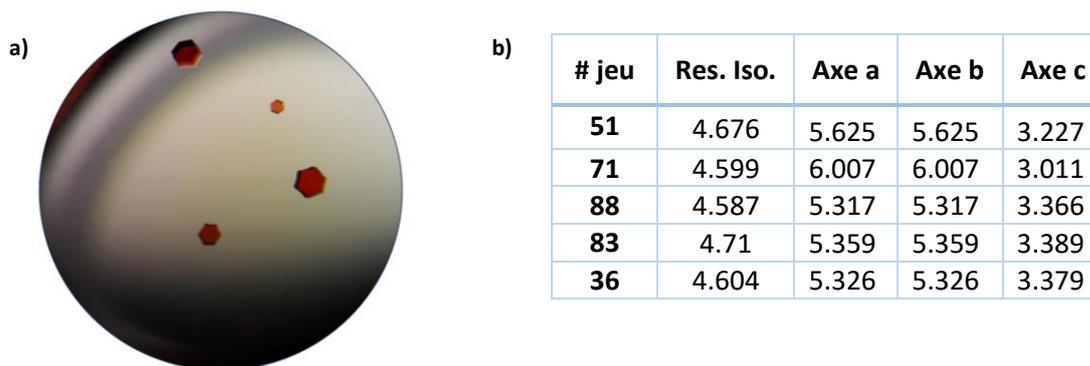


Fig.6.1.4 : Cristaux de SpNox F397W diffractant de manière anisotrope à 3.3Å. (a) Cristaux obtenus avec 8mg/ml de protéine, 30,5% PEG300, NaCl 0.15M, Li2SO4 0.15M, 0.1M MES pH6 selon un ratio protéine:solution de 5:5 présentant une diffraction anisotrope de 3.366Å. (b) Tableau des limites de résolution mesurés suivant les 3 axes des cristaux de SpNox pour les 5 meilleurs jeux de données. La colonne Res. Iso. correspond aux limites de résolution déterminées en considérant une diffraction isotrope. Les colonnes Axe a, b et c correspondent respectivement aux limites de résolution mesurées selon les directions a, b et c du cristal. Les limites de résolution sont exprimées en Å. La différence entre les résolutions maximales isotropes et anisotropes met en avant l'intérêt du traitement des données par Staraniso.

B. Remplacement moléculaire et affinement de la structure ¹de SpNox sous forme entière

a. Remplacement moléculaire

Ainsi, après traitement de l'anisotropie de la diffraction à partir des données collectées sur les meilleurs cristaux de SpNox F397W, un remplacement moléculaire a été initié sur le jeu données présentant l'anisotropie la plus faible, c'est-à-dire avec la résolution la plus haute selon les axes *a* et *b* (jeu #88, Fig.6.1.4.b) en utilisant comme modèle de référence la structure à haute résolution du domaine DH résolue au cours de ce projet ainsi que le modèle d'homologie de SpNox afin de résoudre les phases du cristal.

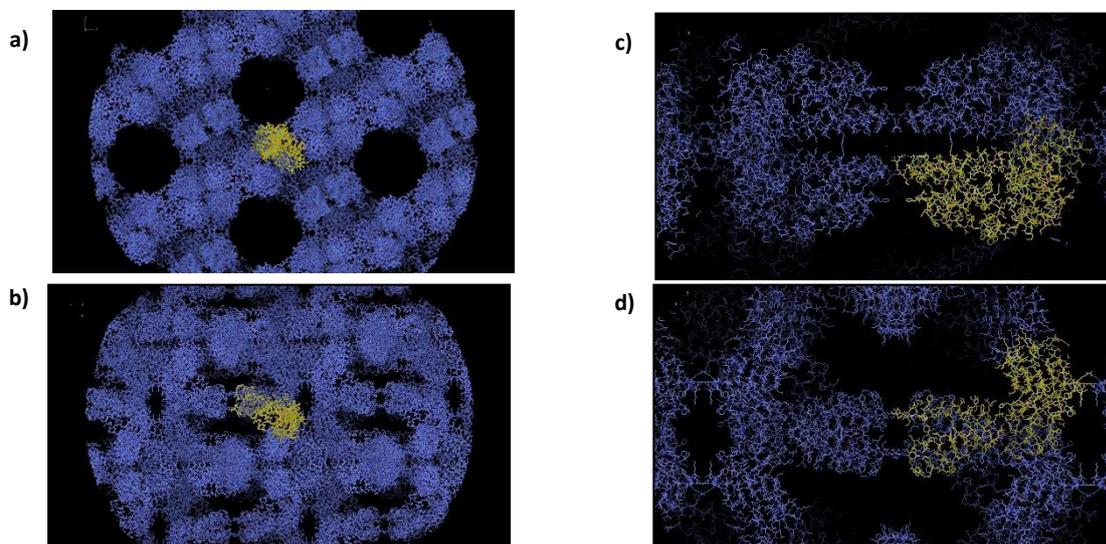


Fig.6.1.5 : Empilement cristallin de la solution obtenue par phasage des données de diffraction traitées par STARANISO par MR. Vue de l'empilement cristallin suivant l'axe z (a) ou x (b) de l'espace. (c) Détails des contacts cristallins de SpNox via une interaction entre les domaines TM ou DH de deux protéines adjacentes (d) selon une rotation de 90°.

L'analyse de la solution issue de ce phasage initial démontre l'absence de conflit structuraux entre les chaînes au sein de l'empilement cristallin, ainsi que la présence de zones d'interactions caractéristiques des protéines membranaires de types II [7], impliquant d'une part les domaines

¹ La structure présentée dans ce chapitre est encore en cours d'affinement

transmembranaires hydrophobes de deux protéines adjacentes et les régions déshydrogénases hydrophiles d'autre part, conférant ainsi de la crédibilité à cette solution.

De plus, l'observation de l'empilement structural de SpNox sous forme entière met en évidence la présence de larges canaux de solvant au sein du cristal, dont la densité en protéine est beaucoup plus faible que dans les cristaux du domaine DH seul.

La solidité de la solution ainsi déterminée a été évaluée en détail par comparaison de la structure issue de la densité électronique avec le modèle de SpNox issu de l'ancrage des deux domaines indépendants de la protéine. L'analyse de la superposition semble montrer que les structures des domaines déshydrogénase se superposent correctement, contrairement à la partie transmembranaire, dont l'orientation semble avoir subi une rotation de 180° par rapport à la référence constituée par le modèle d'homologie. En effet, la solution proposée situe l'extrémité C-ter du domaine TM à l'opposé de l'extrémité N-ter du domaine DH, imposant un écart de 39Å entre les deux alors que seulement 5 résidus sont manquants pour relier les 2 domaines, suggérant ainsi que la structure déterminée à travers le remplacement moléculaire initial, réalisé à partir du modèle d'homologie, n'est pas compatible avec les contraintes structurales intrinsèques à la chaîne polypeptidique de SpNox et ne semble donc pas représentative de la réalité.

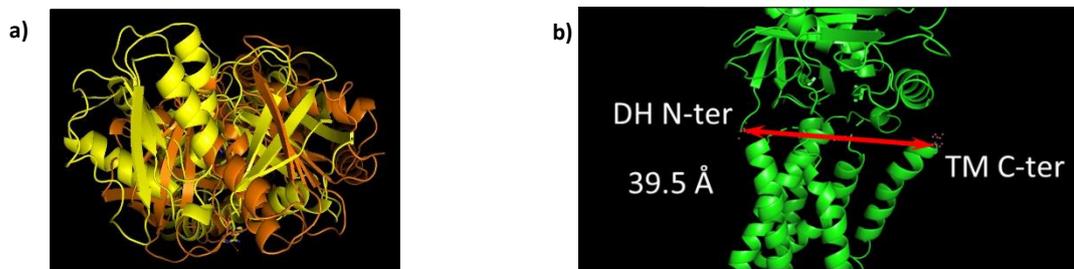


Fig.6.1.6 : Vérification de la validité de la solution issue du remplacement moléculaire réalisé avec le modèle d'homologie initial. (a) Superposition de la solution issue du remplacement moléculaire avec le TM du modèle d'homologie témoignant d'une rotation de 180° entre les domaines TM des deux modèles. (b) Mesure de la distance entre l'extrémité C-terminale du TM et N-terminale du domaine DH de la solution issue du remplacement moléculaire, et théoriquement contiguës d'après la séquence polypeptidique de SpNox_{FL}.

En absence de solution satisfaisante directement apportée par l'utilisation du modèle d'homologie en tant que modèle de référence pour le remplacement moléculaire, et en raison des contraintes liées à la rédaction de la thèse, la construction un nouveau modèle du domaine transmembranaire a été confiée à Michel Thépaut, un membre de l'équipe possédant une expertise en cristallographie, en se basant sur de nouveaux alignements de séquences manuels de chacune des hélices individuelles de SpNox avec celles de CsNox en respectant les critères suivants :

- Alignement des histidines fixant les hèmes.
- Alignement des hélices réelles de CsNox (500t) avec les prédictions d'hélices pour SpNox obtenues à l'aide du serveur TMHMM
- Retrait des sauts générés par ClustalW au sein des les hélices.
- Positionnement des sauts au milieu des boucles.

La comparaison de ce nouvel alignement des deux domaines TM avec le précédent ne témoigne d'aucune différence structurale majeure mais permet cependant d'atteindre un meilleur score de similarité lors de l'alignement avec le domaine TM de CsNox.

L'utilisation du logiciel CHAINSAW (CCP4) a ensuite permis, à partir du nouvel alignement, de générer un nouveau modèle du domaine transmembranaire de SpNox. Le remplacement moléculaire a donc

été réalisé à nouveau à l'aide de PHASER (CCP4) en soumettant comme modèle de référence la structure haute résolution du domaine DH de SpNox ainsi que le nouveau modèle du domaine transmembranaire, aboutissant finalement à un positionnement du domaine transmembranaire en accord avec la localisation du domaine DH avec un écart entre l'extrémité C-ter du TM et N-ter du DH réduit à 10Å pour un résidu manquant.

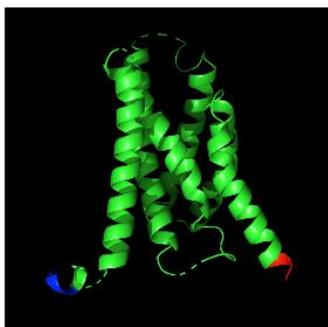


Fig.6.1.7 : Nouveau modèle d'homologie du domaine TM de SpNox. Le nouveau modèle d'homologie du domaine TM a été conçu sur le serveur Chainsaw à l'aide d'un alignement réalisé par alignement manuels individuels de chacune des hélices transmembranaires de SpNox avec celles de CsNox. L'extrémité N-ter est représentée en bleu et l'extrémité C-ter en rouge.

De plus, l'analyse de la carte de densité électronique Fo-Fc, renseignant sur la différence de densité électronique entre les données observées à partir du cristal et les données calculées à partir du modèle, révèle que cette solution présente un pic positif important à 6.1 σ entre les histidines 83 et 142 du domaine transmembranaire, démontrant ainsi qu'un atome de haute densité électronique, pouvant notamment correspondre au fer de l'hème proximal chélaté par SpNox, est attendu à cette position dans le modèle. Cette observation, en accord avec l'architecture attendue de SpNox, confère beaucoup de réalisme à la nouvelle solution apportée à l'issue du processus de remplacement moléculaire.

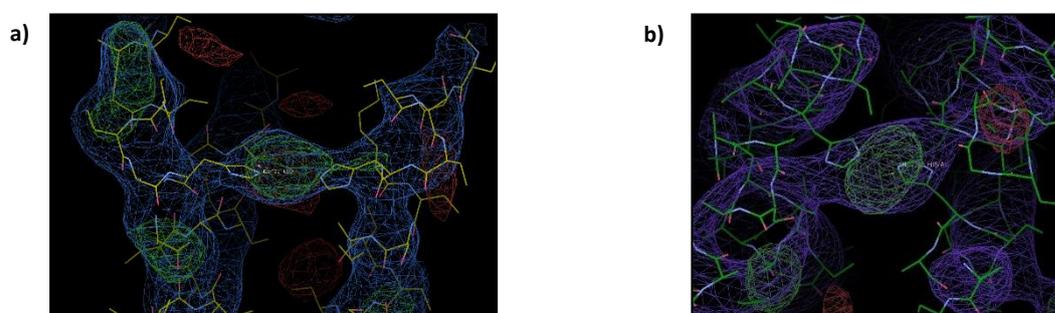


Fig.6.1.8 : Carte de densité électronique Fo-Fc présentant des pics positifs pouvant correspondre aux hèmes chélatés par la protéine. (a) La carte Fo-Fc révèle un atome de haute densité électronique entre les histidines chélatant l'hème proximal. (b) Le second hème, pour lequel les cartes Fo-Fc et 2Fo-Fc présentent respectivement un pic à 3 σ et à 1.1 σ , est en revanche moins bien prédit sur des hélices distinctes des hélices 3 et 5 de SpNox chélatant les hèmes.

De plus la carte Fo-Fc indique également la présence d'un second pic de haute densité électronique pouvant être attribué à l'hème distal entre les histidines 79 et 138 conservées sur des hélices distinctes des hélices 3 et 5, comportant les histidines conservées permettant la chélation des deux hèmes de SpNox.

Bien qu'un important travail d'affinement soit encore nécessaire, la présence de ces pics positifs aux emplacements attendus des hèmes constitue un indice de confiance important en faveur de cette solution.

Ainsi, un intense travail d'affinement manuel complexifié par la faible résolution de la densité électronique, a été réalisé par Michel Thépat. Afin de pallier au manque de détails structuraux, le

pipeline LORESTR (CPP4), dédié au traitement des structures à basse résolution, a été utilisé, notamment pour la relocalisation des hélices au sein de la densité électronique (Fig.6.1.9)

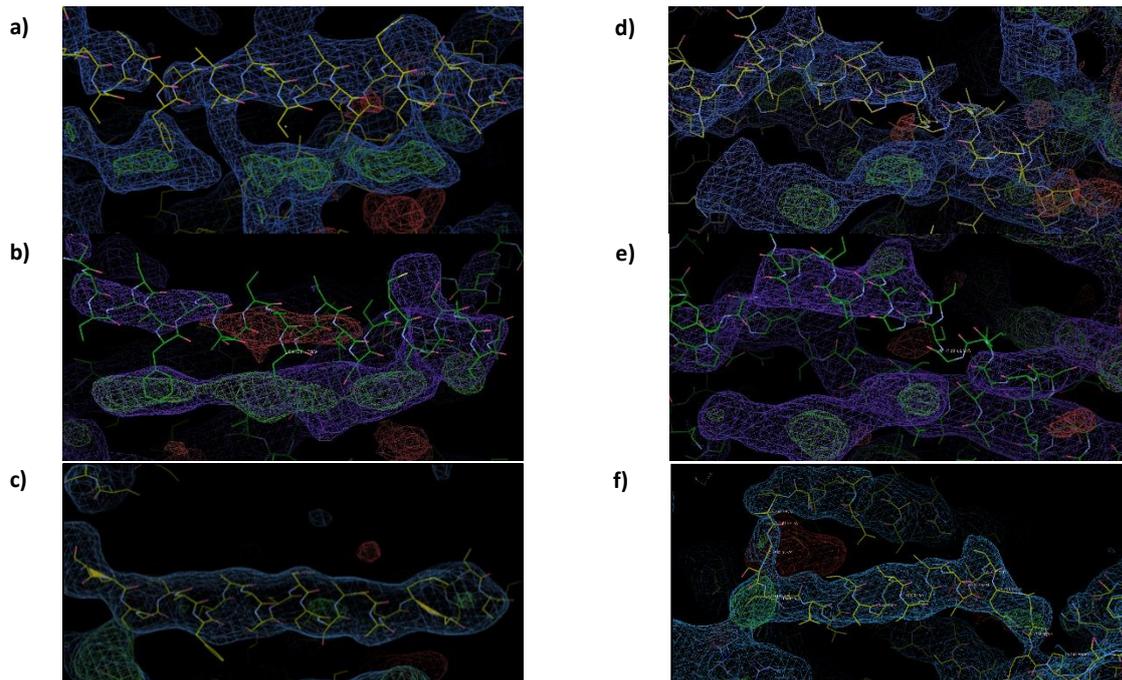


Fig.6.1.9 : Exemples d'affinement manuel de la structure de SpNox permettant le placement correct des hélices au sein de la densité électronique. (a, b, c) Hélice composée par les résidus 8-30. (d, e, f) Hélice composée par les résidus 165-180. (a, d) Carte de densité issues de PHASER avant le remplacement des hélices. (b, e) Carte de densité issues de LORESTR avant le remplacement des hélices. (c, f) Cartes de densité issues de LORESTR après le remplacement des hélices. $2Fo-Fc$ à 1.1σ et $Fo-Fc$ à 3σ .

Cette approche a finalement permis d'envisager une solution pour la résolution de la première structure cristallographique à basse résolution de SpNox sous sa forme entière.

Cependant, un important travail d'affinement, auquel je pourrai contribuer dans les mois à venir, est encore nécessaire avant de pouvoir procéder à des analyses de la structure et extraire des informations fiables.

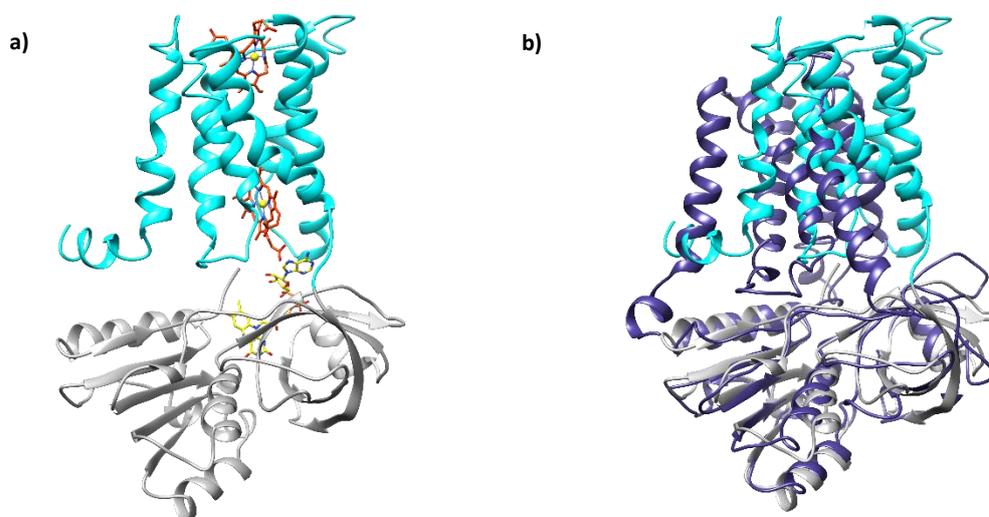


Fig.6.1.10 : Etat actuel de la structure cristallographique basse résolution de SpNox sous forme entière. Les données de diffraction ont été extraites à l'aide du serveur STARANISO dédié aux cristaux présentant une forte anisotropie de diffraction (a) Le domaine TM jusqu'au résidu K181 (exclu) est représenté en bleu et le DH est représenté en gris au sein de la structure de SpNox sous forme entière. (b) Superposition de la structure basse résolution de SpNox sous forme entière avec le modèle d'homologie de SpNox (violet) obtenu par ancrage des modèle de chacun des domaines isolés.

Cependant, une analyse superficielle de la structure en cours d'affinement semble indiquer que la protéine cristallise dans une conformation relativement ouverte par rapport au modèle ancré de SpNox ou de CsNox utilisé jusqu'à présent. Cette observation serait en accord avec la haute flexibilité prédite entre les domaines par les études de SANS et mises en évidence par les modèles *ab-initio* de SpNox présentant une enveloppe plus large que le modèle d'homologie. Ainsi la cristallisation aurait piégé un des états ouverts du DH par rapport au TM, tel que postuler à partir des conclusions de SANS et des tentatives classiques de résolution (sans prendre en compte l'anisotropie).

Afin de vérifier la cohérence de la structure basse résolution de SpNox sous forme entière, celle-ci a été ancrée par alignement structural avec le modèle d'homologie initialement présent au sein de l'enveloppe SANS, résultant de l'ensemble des conformations adoptées par SpNox en solution.

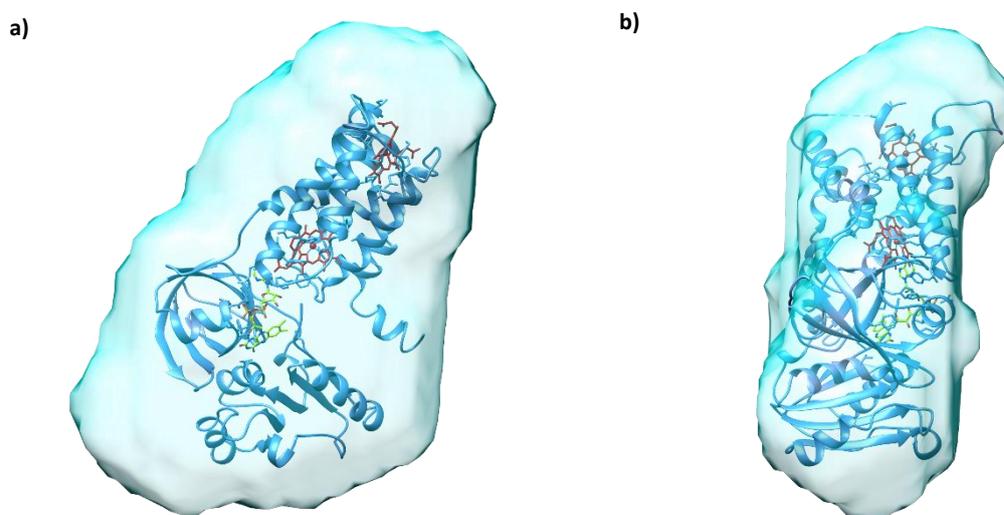


Fig.6.1.11 : Comparaison de la structure basse résolution de SpNox sous forme entière et de l'enveloppe SANS La structure basse résolution a été ancrée dans l'enveloppe SANS manuellement à l'aide du logiciel Chimera. Comparaison structurale de l'enveloppe avec la structure vue de côté (a) ou de face (b).

Le volume de la structure de SpNox, occupant plus d'espace que le modèle d'homologie, semble en accord avec celui de l'enveloppe SANS, témoignant de la grande flexibilité existant au niveau de la charnière entre les domaines TM et DH de la protéine semble confirmer que la protéine aurait pu cristalliser dans une conformation ouverte, proche des différents états de la protéine en solution observée en SANS.

Bien que le processus d'affinement pourrait légèrement modifier le placement des résidus par rapport à la structure basse résolution actuelle et ainsi moduler les observations, par analogie à l'étude précédant (Chapitre 5), l'observation préliminaire de l'interface de contact entre les domaines TM et DH de la protéine été réalisée. En effet lors du chapitre précédent, une correspondance avait été mise en évidence au niveau du potentiel électrostatique des parties inférieure et supérieure respectivement du TM et du DH qui pourrait être impliqué dans le maintien de l'interaction inter-domaine au moment du transfert d'électron.

En raison de l'ouverture entre les deux domaines et de l'orientation du TM par rapport au DH, une seule des trois régions électrostatiques complémentaires identifiées dans le chapitre 5 est observable à partir de la solution obtenue sur la protéine entière et pourrait éventuellement favoriser l'interaction des domaines TM et DH au moment du transfert d'électron à travers la membrane.

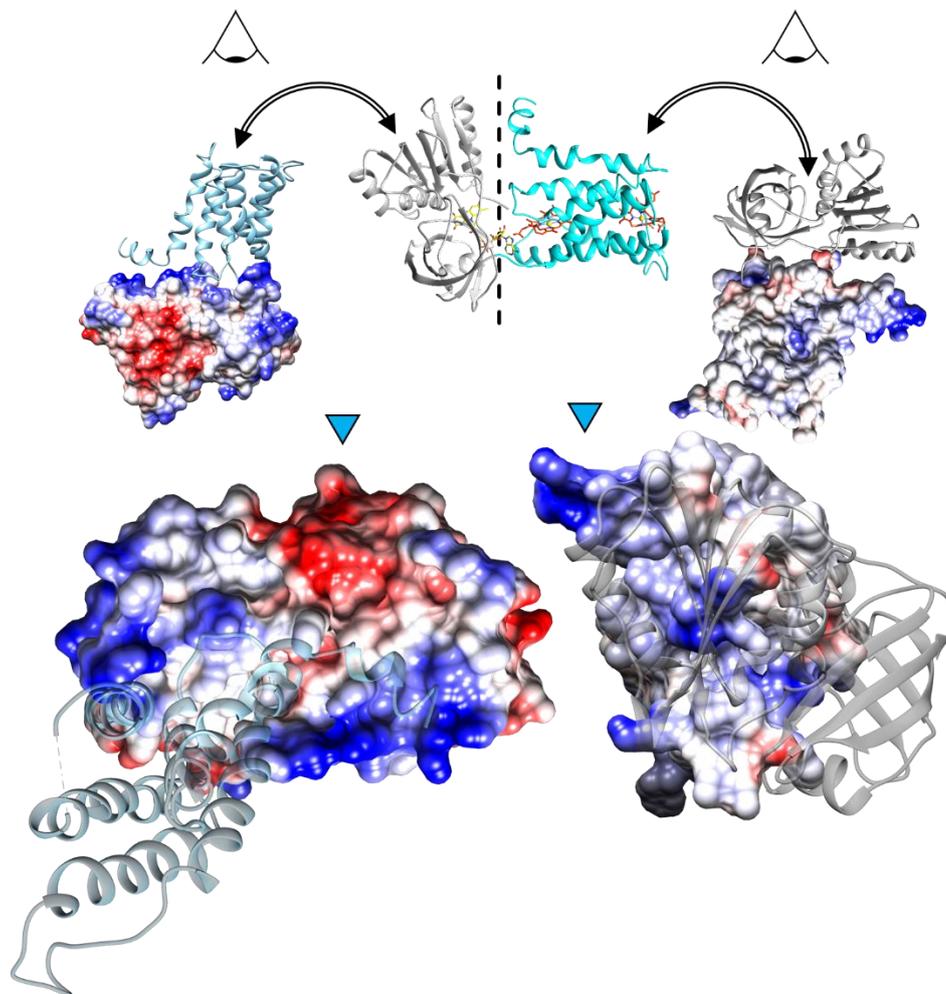


Fig.6.1.11 : Complémentarité géométrique et électrostatique des domaines de SpNox. (a) Observation de la surface d'interface du DH en vue de dessus. Le DH est modélisé en surface et coloré en fonction du potentiel électrostatique. Le TM est représenté en ruban. (b) Observation de la surface d'interface du TM en vue de dessous. Le TM est modélisé en surface et coloré en fonction du potentiel électrostatique. Le DH est représenté en ruban. Les vues représentées sont similaires à celles du chapitre 5.

3. Conclusion

L'important travail de cristallogénèse réalisé, associé à cette approche, a finalement permis l'interprétation de données de diffraction complexes, de résoudre les phases du cristal de SpNox sous forme entière et ainsi d'établir une solution en cours de construction afin de résoudre la structure cristallographique à basse résolution de SpNox, qui constituerait ainsi la première structure de NOX procaryote sous forme entière. Bien que la résolution de cette structure ne soit pas optimale, celle-ci représente une avancée importante qui pourrait constituer une étape intermédiaire vers une structure à plus haute résolution. En effet, en fournissant des informations approximatives sur les distances entre résidus, une stratégie impliquant l'introduction de mutations permettant de ponter spécifiquement les deux domaines pourrait ainsi être envisagée afin de réduire la flexibilité de SpNox.

En tant qu'enzymes spécialisées dans la production de ROS, le rôle des NADPH oxydases s'étend à de nombreux des processus physiologiques majeurs, et la dérégulation de celles-ci peut conduire à une grande variété de pathologies sévères, telles que le diabète ou les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, constituant ainsi une cible primordiale pour le développement de solutions thérapeutiques spécifiquement adaptées.

Malgré la découverte récente d'homologues procaryotes de NOX, facilitant la production de ces protéines en quantités compatibles pour les études mécanistiques, et constituant ainsi des modèles favorisant l'étude fonctionnelle et structurale de la famille des NADPH oxydases, la résolution d'une structure haute résolution sous la forme entière, demeure sans solution.

En effet, les essais préliminaires de caractérisation structurale sur SpNox avaient toujours conduit à des solutions dont la qualité de diffraction était insuffisante, obligeant dans le cas de CsNox, un homologue de NOX5 issu de cyanobactéries, à adopter une stratégie constituant à résoudre la structure de chacun des domaines indépendants. Bien que l'ancrage de ceux-ci fournisse un modèle d'étude, les informations apportées ne sont pas suffisantes pour comprendre les détails moléculaires de la mécanistique de transfert d'électrons à l'interface des deux domaines, suggérant ainsi que des progrès majeurs doivent encore être accomplis afin de résoudre un objectif aussi ambitieux que de résoudre la première structure entière d'une NADPH oxydase.

Ainsi, à travers l'utilisation d'une approche interdisciplinaire, ce projet avait pour but de relever les enjeux majeurs associés à l'obtention de cristaux dont la qualité de diffraction permettrait la résolution de la première structure d'un homologue de NADPH oxydase sous forme entière, complexifiée par la présence de larges zones hydrophobes intrinsèques au rôle de transfert d'électrons à travers les membranes de ces protéines, et pouvant altérer la formation et l'intégrité des contacts cristallins.

Afin de surmonter ces difficultés, ces objectifs ont été abordés à travers l'utilisation d'une stratégie intégrative associant des caractérisations biochimiques et structurales à différentes échelles pour comprendre, à travers l'interprétation des informations apportées par diverses techniques complémentaires, l'origine des difficultés rencontrées sur la protéine sous forme entière et ainsi adapter les approches envisagées afin de favoriser au mieux l'étude structurale de SpNox.

A travers l'étude de la thermostabilité ainsi que de l'activité enzymatique, des progrès significatifs ont été accomplis autant du point de vue fonctionnel que structural. Des conditions optimales de détergents et de tampons au sein de laquelle l'enzyme combine une importante activité associée à une haute thermostabilité ont été identifiées par criblage systématique des conditions de sels et pH pour la purification de l'enzyme et ainsi optimiser la préservation de l'intégrité de la protéine afin de favoriser la qualité des cristaux obtenus.

De plus, à travers l'implémentation d'étapes conjointes de criblages ainsi que d'affinements automatiques et manuels extensifs impliquant une analyse systématique, un effort intense a ainsi été initié afin d'optimiser le processus de cristallogénèse et des avancées majeures ont pu être réalisées concernant la cristallisation de SpNox, en permettant notamment l'obtention de nombreux cristaux rouges hexagonaux permettant d'améliorer la diffraction des cristaux initiaux de 11Å à 4.3Å. L'introduction de mutations stabilisantes, en favorisant un état conformationnel plus homogène au sein des cristaux de SpNox, a également contribué à l'amélioration de la qualité de diffraction globale des cristaux. La résolution ainsi atteinte devrait permettre d'initier la construction de la chaîne polypeptidique de la protéine et représente une avancée significative de la limite de diffraction.

En parallèle, une caractérisation basse résolution, réalisée par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS), a permis de déterminer une enveloppe globale de protéine correspondant aux différents états conformationnels de la protéine en solution. Le volume de cette enveloppe, ainsi que l'analyse des données SANS (Kratky plot), plus large que le modèle d'homologie de la protéine sous forme entière reconstituée par l'ancrage des deux domaines modélisés indépendamment, suggère l'existence d'une flexibilité importante de SpNox dans la région charnière entre les deux domaines TM et DH, fournissant ainsi des informations essentielles apportant une explication aux difficultés rencontrées pour abaisser la limite de résolution des cristaux.

Afin de s'affranchir de la flexibilité liée à la présence de deux domaines structurellement indépendants au sein de la protéine, une stratégie complémentaire, impliquant la caractérisation structurale de chacun des domaines dissociés de SpNox a été initiée en exprimant et caractérisant avec succès les domaines TM et DH de SpNox de manière isolée. Malgré l'absence de cristaux présentant une diffraction inférieure à 10Å pour le TM selon une approche en phase cubique, des développements considérables ont été réalisés grâce à l'obtention de cristaux du domaine déshydrogénase issus de deux constructions distinctes, WT et F397W, dont la qualité a permis la collecte de données selon des limites de diffraction atteignant respectivement 1.8Å et 2.4Å, et permettant ainsi d'accéder à des informations à une résolution atomique, autorisant la visualisation de détails structuraux au sein de ce domaine, qui, en association avec le modèle d'homologie du TM, peut servir à guider certaines études fonctionnelles.

En effet, à travers l'utilisation de dérivés de flavine de tailles progressives, l'existence d'interactions entre le FAD et chacun des domaines de SpNox, intervenant sur l'ensemble de la longueur de la flavine pour favoriser une augmentation considérable de l'affinité de la protéine pour le cofacteur, a ainsi pu être mise en évidence. De plus, la comparaison des affinités des versions de protéines mutantes F397W et WT pour les coenzymes ont également permis de révéler au sein de SpNox, l'existence d'une modulation de l'accès au NADPH au sein du site actif par l'intermédiaire d'un mécanisme d'ouverture/fermeture, répandu dans la famille des FNR, et démontrant largement la nécessité de poursuivre la réalisation d'études structurales et fonctionnelles mutuellement informées, permettant d'accéder aux détails mécanistiques de l'enzymes.

En parallèle des caractérisations structurales, la réalisation d'études fonctionnelles sur les domaines indépendants de SpNox suggère l'existence d'une modularité au sein de l'enzyme, qui constituerait ainsi, un système à deux composants fusionnés. Au cours d'une approche exploratoire, cette modularité a été généralisée à l'étude de l'activation des NOX eucaryotes à travers l'élaboration de chimères, fusionnant le domaine TM humanisé par la substitution des boucles internes, permettant ainsi de fournir une plateforme compatible à la production procaryote, avec le DH d'isoformes eucaryotes de NOX portant les sites d'interaction aux sous-unités cytosoliques. Bien qu'accéder à des études directes sur un sous-domaine de NOX permettrait d'élever les études fonctionnelles sur le mécanisme d'activation et de régulation des NOX eucaryotes à une portée étendue au-delà des travaux réalisés jusqu'à lors, notamment en fournissant un outil adapté pour des criblages de molécules capables de moduler l'activité des NOX, cette approche est restée à l'état préliminaire et pourra être poursuivie au cours d'un projet futur.

Enfin, le traitement des données de diffractions de manière à interpréter l'anisotropie au sein de cristaux de SpNox_{FL}, et ainsi extraire le maximum d'informations contenant les détails structuraux, la résolution atteinte a encore pu être améliorée à 3.2Å selon le meilleur axe de diffraction, et permettait ainsi de résoudre la première structure basse résolution de NOX entière. Bien que la qualité de la densité électronique obtenue nécessite encore de longues étapes d'affinements, et que la résolution globale ne permettra probablement pas encore la visualisation de l'ensemble des détails nécessaires

à la compréhension de la mécanistique enzymatique et au design spécifique d'inhibiteurs constituant de potentiels candidats en tant que molécules thérapeutiques, l'obtention de cette structure, présentant probablement un état ouvert de la protéine compatible avec la flexibilité démontrée par les études SANS, constitue une avancée importante et représente une étape intermédiaire nécessaire vers l'obtention d'une structure haute résolution. En effet, l'observation de distances approximatives entre les résidus pourra permettre une approche de biologie moléculaire à travers des processus de mutagenèses informé par les données structurales, afin notamment d'introduire des mutations stabilisantes, ou permettant de ponter les deux domaines et ainsi de réduire la flexibilité de l'enzyme constatée lors de l'étude SANS.

Cette stratégie pourrait résulter en une amélioration significative de la résolution de 4.2Å des cristaux de SpNox sous forme entière afin de s'approcher encore du but ultime de ce projet complexe.

La résolution de la première structure haute résolution d'un homologue procaryote de NADPH oxydase représenterait une contribution majeure vers une meilleure compréhension des enzymes de la famille des NOX et, en participant à décrypter le mécanisme de transfert d'électrons, constituerait un support essentiel au développement de molécule thérapeutiques spécifiquement conçues pour la modulation de l'activité isoformes de NOX et constituerait ainsi une découverte fondamentale.

Finalement considérés en intégrité, les résultats apportés par ces travaux, conduits selon une approche structurale intégrative à travers l'utilisation complémentaire de multiples techniques à différentes échelles, confèrent de nouvelles perspectives encourageantes, qui pourront être poursuivies au cours d'un projet ultérieur notamment :

- La structure basse résolution pourra permettre l'identification plus fiable qu'à partir du modèle d'homologie de potentiels candidats de résidus à muter pour compléter l'étude fonctionnelle de SpNox.
- A travers une meilleure définition des boucles ainsi que des bornes entre les domaines, cette structure basse résolution pourra constituer un socle plus solide pour l'élaboration de chimères entre le domaine TM procaryote humanisé au niveau des boucles internes, et fusionné au domaine déshydrogénase d'isoformes eucaryotes, fournissant ainsi un modèle plus proche de la réalité pour l'étude fonctionnelle et structurale des NADPH oxydases eucaryotes, encore trop complexe à ce jour.
- Continuer l'optimisation des cristaux : bien que les conditions mises en évidence aient déjà largement été criblées, l'effort considérable déjà réalisé pourrait être poursuivi et constitue une base solide pour de futurs développement, notamment, une approche d'ensemencement aléatoire a conduit à l'identification de 96 nouvelles conditions susceptibles de fournir des cristaux de meilleure qualité et constitue ainsi des pistes intéressantes à explorer.
- Un processus impliquant l'utilisation de nanobodies a été initié récemment et pourrait être une solution adaptée pour ponter les deux domaines ou améliorer les contacts cristallins et conduire à une meilleure résolution
- Le changement de détergent pour la cristallogénèse, notamment à travers l'utilisation de DMNG, dont la structure ressemble au LMNG, mais dont la taille inférieure des micelles pourrait favoriser les contacts cristallins.
- A plus courte portée, dans les quelques mois à venir, je pourrai avoir l'opportunité me consacrer à l'avancement des nombreux travaux en cours sur les structures en cours de résolution.

BIBLIOGRAPHIE

VII

Bibliographie Partie I - Introduction

- [1] J. M. Gutteridge et B. Halliwell, «Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success?,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 183-186, 2018.
- [2] J. P. Kehrer, J. D. Robertson et C. V. Smith, «Free Radicals and Reactive Oxygen Species,» chez *Comprehensive Toxicology*, vol. 139, 2010, pp. 277-307.
- [3] R. A. Larson et J. M. McCord, «Environmental chemistry of reactive oxygen species,» *C R C Critical Reviews in Environmental Control*, vol. 8, pp. 197-246, 1977.
- [4] A. Phaniendra, D. B. Jestadi et L. Periyasamy, «Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases,» *Ind. J. Clin. Biochem.*, vol. 30, pp. 11-26, 2015.
- [5] T. L. Dawson, G. J. Gores, A.-L. Nieminen, B. Herman et J. J. Lemasters, «Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes,» *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 264, p. C961–C967, 1993.
- [6] M. Takahashi et K. Asada, «Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids,» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 226, p. 558–566, 1983.
- [7] J. M. Gutteridge, «Biological origin of free radicals, and mechanisms,» *Chemico-Biological Interactions*, vol. 91, pp. 133-140, 1994.
- [8] C. M. Spickett, A. J. O. M. Panasenko, J. Arnhold, A. R. Pitt, T. Stelmazyńska et R. J. Schaur, «The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids,» *Acta Biochemica Polonica*, vol. 47, p. 889–899, 2000.
- [9] S. Parvez, M. J. C. Long, J. R. Poganik et Y. Aye, «Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants,» *Chem. Rev.*, vol. 118, p. 8798–8888, 2018.
- [10] K. R. Olson, Y. Gao, F. Arif, K. Aror, S. Patel, E. DeLeon, T. Sutton, M. Feelisch, M. Cortese-Krott et K. D. Straub, «Metabolism of hydrogen sulfide (H₂S) and Production of Reactive Sulfur Species (RSS) by superoxide dismutase,» *Redox Biology*, vol. 15, pp. 74-85, 2018.
- [11] J. D. Lambeth et A. S. Neish, «Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited,» *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 9, pp. 119-145, 2014.
- [12] S. S. Marla, J. Lee et J. T. Groves, «Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, p. 14243–14248, 1997.
- [13] A. J. Kowaltowski, N. C. d. Souza-Pinto, R. F. Castilho et A. E. Vercesi, «Mitochondria and reactive oxygen species,» *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 47, p. 333–343, 2009.
- [14] P. K. Jensen, «Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles - I. pH dependency and hydrogen peroxide formation.,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, vol. 122, p. 157–166., 1966.

- [15] M. J. Morgan et Z.-g. Liu, «Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling,» *Cell Research*, vol. 21, pp. 103-115, 2011.
- [16] B. C. Dickinson et C. J. Chang, «Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling,» *Nat Chem Biol.*, vol. 7, p. 504–511, 2012.
- [17] L. A. d. Rio et E. Lopez-Huertas, «ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling,» *Plant Cell Physiol.*, vol. 57, p. 1364–1376, 2016.
- [18] J. D. Lambeth, «NOX enzymes and the biology of reactive oxygen,» *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, p. 181–189, 2004.
- [19] K. Bedard et K.-H. Krause, «The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology,» *Physiol. Rev.*, vol. 87, p. 245–313, 2007.
- [20] G. Y. N. Iyer, M. F. Islam et J. H. Quastel, «Biochemical Aspects of Phagocytosis,» *Nature*, vol. 192, p. 535–541, 1961.
- [21] Y. Suh, R. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, C. A. B., K. K. Griendling et J. D. Lambeth, «Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1,» *Nature*, vol. 401, p. 79–82, 1999.
- [22] A. Strzepa, K. A. Pritchard et B. N. Dittel, «Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity,» *Cellular Immunology*, vol. 317, pp. 1-8, 2017.
- [23] Y. Aratani, «Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function,» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 640, p. 47–52, 2018.
- [24] P. Hochstein, «Futile redox cycling: Implications for oxygen radical toxicity,» *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 3, p. 215–217, 1983.
- [25] C. C. Winterbourn, «Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species,» *Nature Chemical Biology*, vol. 4, pp. 278-286, 2008.
- [26] M. J. Davies, «The oxidative environment and protein damage,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1703, p. 93–109, 2005.
- [27] E. R. Stadtman et R. L. Levine, «Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins,» *Amino Acids*, vol. 25, p. 207–218, 2003.
- [28] W. M. Garrison, «Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins,» *Chemical Reviews*, vol. 87, p. 381–398, 1987.
- [29] R. C. Cumming, N. L. Andon, P. A. Haynes, M. Park et W. H. Fischer, «Protein Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm during Oxidative Stress,» *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 21749-21758, 2004.
- [30] T. F. Brewer, F. J. Garcia, C. S. Onak, K. S. Carroll et C. J. Chang, «Chemical Approaches to Discovery and Study of Sources and Targets of Hydrogen Peroxide Redox Signaling Through NADPH Oxidase Proteins,» *Annual Review of Biochemistry*, vol. 84, pp. 765-790, 2015.

- [31] M. L. Conte et K. S. Carroll, «The Chemistry of Thiol Oxidation and Detection,» chez *Oxidative Stress and Redox Regulation*, Springer, 2013.
- [32] T. Tasaki et Y. T. Kwon, «The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles,» *Trends Biochem Sci.*, vol. 32, pp. 520-527, 2007.
- [33] N. A. Porter, «Mechanisms for the Autoxidation of Polyunsaturated Lipids,» *Ace. Chem. Res.*, vol. 19, pp. 262-268, 1986.
- [34] A. Sallmyr, J. Fan et F. V. Rassool, «Genomic instability in myeloid malignancies: Increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair,» *Cancer Letters*, vol. 270, p. 1–9, 2008.
- [35] A. P. Grollman et M. Moriy, «Mutagenesis by 8-Oxoguanine: an enemy within,» *TIG*, vol. 9, 1993.
- [36] F. M. Yakes et B. V. Houten, «Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, p. 514–519, 1997.
- [37] B. Halliwell et J. M. C. Gutteridge, «The antioxidants of human extracellular fluids,» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 280, p. 1–8, 1990.
- [38] J. M. McCords et I. Fridovich, «Superoxide Dismutase,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, pp. 6049-6065, 1969.
- [39] O. Ighodaro et O. Akinloye, «First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid,» *Alexandria Journal of Medicine*, vol. 54 , p. 287–293, 2018.
- [40] R. Brigelius-Flohé et M. Maiorino, «Glutathione peroxidases,» *Biochimica et Biophysica Acta* , vol. 1830, p. 3289–3303, 2013.
- [41] A. Perkins, K. J. Nelson, D. Parsonage, L. B. Poole et P. A. Karplus, «Peroxiredoxins: Guardians Against Oxidative Stress and Modulators of Peroxide Signaling,» *Trends Biochem Sci.*, vol. 40, p. 435–445, 2015.
- [42] D. A. Dickinson et H. J. Forman, «Cellular Glutathione and Thiols Metabolism,» *Biochemical Pharmacology*, vol. 64, pp. 1019-1026, 2002.
- [43] A. L. Santos, S. Sinha et A. B. Lindner, «The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New Insights on Aging and Aging-Related Diseases from Eukaryotic and Prokaryotic Model Organisms,» *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, pp. 1-23, 2018.
- [44] M. Ogrunc, «Reactive oxygen species: The good, the bad, and the enigma,» *Mol Cell Oncol.*, vol. 1, pp. e964033-1-2, 2014 .
- [45] I. Juránek, D. Nikitovic, D. Kouretas, A. W. Hayes et A. M. Tsatsakis, «Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants,» *Food and Chemical Toxicology*, vol. 61, p. 240–247, 2013.

- [46] P. D. Ray, B.-W. Huang et Y. Tsuji, «Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling,» *Cellular Signalling*, vol. 24, p. 981–990, 2012.
- [47] F. Vatansever et e. al., «Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond,» *FEMS Microbiol Rev. Nov*, vol. 37, p. 955–989, 2013 .
- [48] S. G. Rhee, «H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling,» *Science*, vol. 312, 2006.
- [49] C. Nathan et A. Cunningham-Bussel, «Beyond oxidative stress: an immunologist’s guide to reactive oxygen species,» *Nat Rev Immunol.*, vol. 13, pp. 349-361, 2013 .
- [50] H. Sies, «Introductory Remarks,» chez *Oxidative Stress*, London, Academic Press, 1985, pp. 1-8.
- [51] D. Trachootham, J. Alexandre et P. Huang, «Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?,» *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 8 , pp. 579-591, 2009 .
- [52] J. K. Andersen, «Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?,» *Nat Med.*, vol. 10, pp. 18-25, 2004.
- [53] V. Shukla, S. K. Mishra et H. C. Pant, «Oxidative Stress in Neurodegeneration,» *Advances in Pharmacological Sciences*, vol. 2011, pp. 1-13, 2011.
- [54] T. M. Paravicini et R. M. Touyz, «Redox Signaling in Hypertension,» *Cardiovascular Research*, vol. 71 , p. 247 – 258, 2006.
- [55] B. Commoner, J. Townsend et G. Pake, «Free radicals in biological materials,» *Nature*, vol. 174, p. 689–691, 1954.
- [56] D. M. Harman, «Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry,» *Journal of Gerontology*, vol. 11, p. 298–300, 1956.
- [57] C. W. Baldrige et R. W. Gerard, «The Extra Respiration of Phagocytosis,» *American Journal of Physiology*, vol. 103, p. 235–236, 1932.
- [58] B. M. Babio, R. S. K. et J. T. Curnutte, «The Production by Leukocytes of Superoxide,» *The Journal of Clinical Investigation* , vol. 52 , pp. 741-745, 1973 .
- [59] S. J. Klebanoff, A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn et a. W. M. Nauseef, «Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms,» *J Leukoc Biol.* , vol. 93, p. 185–198, 2013.
- [60] S. Dupré-Crochet, «ROS Production in Phagocytes: Why, When, Where ?,» *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 94, pp. 657-670, 2013.
- [61] M. Schieber et N. S. Chandel, «ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress,» *Current Biology*, vol. 24, p. R453–R462, 2014.

- [62] L. B. Poole, «The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry,» *Free Radic Biol Med.*, vol. 0, p. 148–157, 2015 .
- [63] J. Ying, N. Clavreul, M. Sethuraman, T. Adachi et R. A. Cohen, «Thiol Oxidation in Signaling and Response to Stress,» *Free Radic Biol Med.*, vol. 43, p. 1099–1108, 2007 .
- [64] O. Warburg, «Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigeelei,» *Z. Physiol. Chem.*, vol. 57, pp. 1-16, 1908.
- [65] A. Sbarra et M. Karnovsky, «The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes,» *J. Biol. Chem.*, vol. 234, pp. 1355–1362,, 1959.
- [66] F. Rossi et M. Zatti, «Biochemical Aspects of Phagocytosis in Polymorphonuclear Leucocytes. NADH and NADPH Oxidation by the Granules of Resting and Phagocytizing Cells,» *Experientia*, vol. 20, pp. 21-3, 1964 .
- [67] B. Babior, J. Curnutte et B. Kipnes, «Pyridine nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes,» *J. Clin. Invest.*, vol. 56, p. 1035–1042, 1975.
- [68] R. Clark, K. Leidal, D. Pearson et W. Nauseef, «NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide generating system,» *J. Biol. Chem.*, vol. 262, p. 4065–4074, 1987.
- [69] S. Klebanoff, «Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes,» *Science*, vol. 169, p. 1095–1097, 1970.
- [70] H. Berendes, R. Bridges et Good R.A., «A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome,» *Minn Med.*, vol. 40, pp. 309-312, 1957 .
- [71] P. G. Quie, J. G. White, B. Holmes et R. A. Good, «In Vitro Bactericidal Capacity of Human Polymorphonuclear Leukocytes: Diminished Activity in Chronic Granulomatous Disease of Childhood,» *J. Clin. Invest.*, vol. 46, p. 668–679, 1967.
- [72] R. B. Johnston et R. L. Baehner, «Chronic Granulomatous Disease: Correlation Between Pathogenesis and Clinical Findings,» *Pediatrics*, vol. 48 , pp. 730-739, 1971.
- [73] R. Baehner et D. Nathan, « Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease,» *Science* , vol. 155, p. 835–836, 1967.
- [74] B. Holmes, A. Page et R. Good, «Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function,» *J. Clin. Invest.*, vol. 46, p. 1422–1432, 1967.
- [75] A. R. Cross et A. W. Sega, «The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1657, p. 1–22, 2004.
- [76] H. Hattori, «Studies on the labile, stable Nadi oxidase and peroxidase staining reactions in the isolated particles of horse granulocyte,» *Nagoya J. Med. Sci.*, vol. 23, pp. 362-378., 1961 .

- [77] A. W. Segal et O. T. G. Jones, «The Subcellular Distribution and some Properties of the Cytochrome b Component of the Microbicidal Oxidase System of Human Neutrophils,» *Biochem. J.*, vol. 182, pp. 181-188, 1979.
- [78] A. Cross, J. Parkinson et O. Jones, «The superoxide-generating oxidase of leucocytes. NADPH-dependent reduction of flavin and cytochrome b in solubilized preparations,» *Biochem J.*, vol. 223, pp. 337-344, 1984.
- [79] M. C. Dinauer, S. H. Orkin, R. Brown, A. J. Jesaitis et C. A. Parkos, «The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex,» *Nature*, vol. 327, p. 717–720, 1987.
- [80] C. Parkos, R. A. Allen, C. Cochrane et A. Jesaitis, «Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000,» *J. Clin. Invest.*, vol. 80, p. 732–742, 1987 .
- [81] A. M. Harper, M. F. Chaplin et A. W. Segal, «Cytochrome b.245 from human neutrophils is a glycoprotein,» *Biochem. J.*, vol. 227, pp. 783-788, 1985.
- [82] H. Nunoj, D. Rotrosen, J. Gallin et H. Malech, «Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. .Dec 2,,» *Science*, vol. 242, p. 1298–1301, 1988.
- [83] B. Volpp, W. Nauseef et R. Clark, «Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease,» *Science*, vol. 242, pp. 1295-1297, 1988.
- [84] M. Wilde, K. Carlson, D. Manning et S. Zigmond, «Chemoattractant-stimulated GTPase activity is decreased on membranes from polymorphonuclear leukocytes incubated in chemoattractant.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 264, pp. 190-196, 1989 .
- [85] T. DeCoursey, V. Cherny, D. Morgan, B. Katz et M. Dinauer, «The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps,» *J. Biol. Chem.* , vol. 276, pp. 36063-6, 2001 .
- [86] J. W. Meyer, J. A. Holland, L. M. Ziegler, M.-M. Chang, G. Beebe et M. E. Schmitt, «Identification of a Functional Leukocyte-Type NADPH Oxidase in Human Endothelial Cells : A Potential Atherogenic Source of Reactive Oxygen Species,» *Journal of Endothelial Cell Research*, vol. 7, pp. 11-22, 1999 .
- [87] T. P. Szatrowski et C. F. Nathan, «Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells,» *Cancer research*, vol. 51, pp. 794-798, 1991.
- [88] K. K. Griendling, D. Sorescu et M. Ushio-Fukai, «NAD(P)H Oxidase Role in Cardiovascular Biology and Disease,» *Circ Res.* ;, vol. 86, pp. 494-501, 2000.
- [89] B. Bánfi, A. Maturana, S. Jaconi et S. Arnaudeau, «A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1,» *Science* , vol. 287, pp. 138-142, 2000.

- [90] H. Kikuchi, M. Hikage, H. Miyashita et M. Fukumoto, «NADPH oxidase subunit, gp91phox homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells,» *Gene*, vol. 254 , p. 237–243, 2000.
- [91] M. Geiszt, J. B. Kopp, P. Várnai et T. L. Leto, «Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney,» *PNAS*, vol. 97 , pp. 8010-8014, 2000 .
- [92] B. Banfi, G. Molnar, A. Maturana, K. Steger et al, «A Ca²⁺ activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes,» *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 37594–37601, 2001.
- [93] C. Dupuy, R. Ohayon, A. Valent, M.-S. Noël-Hudson, D. Dème et A. Virion, «Purification of a Novel Flavoprotein Involved in the Thyroid NADPH Oxidase,» *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 37265–37269, 1999.
- [94] X. D. Deken, D. Wang, M.-C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J. E. Dumont et F. Miot, «Cloning of Two Human Thyroid cDNAs Encoding New Members of the NADPH Oxidase Family,» *J. Biol. Chem.*, vol. 275, pp. 23227-23233, 2000.
- [95] H. Grasberger et S. Refetoff, «Identification of the Maturation Factor for Dual Oxidase,» *J. Biol. Chem*, vol. 281, pp. 18269-18272, 2006.
- [96] T. G. Gabig et B. M. Babior, «The O₂(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme,» *J. Biol. Chem.*, vol. 254, pp. 9070-9074, 1979 .
- [97] T. L. Leto et M. Geiszt, «Role of Nox Family NADPH Oxidases in Host Defense,» *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, vol. 8, pp. 1549-1961, 2006.
- [98] J. Chen, H. Zeng, Q. Tuo, H. Yu, B. Meyrick et J. Aschner, «NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation,» *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 292, pp. 1664-1674, 2007 .
- [99] P. M. Dang, A. R. Cross et B. M. Babior, «Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, pp. 3001-3005, 2001.
- [100] B. M. Babior, «NADPH oxidase,» *Current Opinion in Immunology*, vol. 16, pp. 42-47, 2004.
- [101] R. Clark, B. Volpp, K. Leidal et W. Nausee, «Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation,» *J Clin Invest.*, vol. 85, pp. 714-721, 1990.
- [102] C. Parkos, M. Dinauer, A. Jesaitis, S. Orkin et J. Curnutte, «Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease.,» *Blood*, vol. 73, pp. 1416-1420, 1989.
- [103] F. R. DeLeo, L. Yu, J. B. Burritt, L. R. Loeterle et C. W. Bond, «Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 92, pp. 7110-7114, 1995.

- [104] T. Kawahara, M. T. Quinn et J. D. Lambeth, «BMC Evol. Biol.,» *Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes*, vol. 7, 2007.
- [105] L. Yu, M. T. Quinn, A. R. Cross et M. C. Dinauer, «Gp91phox is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 95, p. 7993–7998, 1998.
- [106] A. R. Cross et J. T. Curnutte, «The Cytosolic Activating Factors p47phox and p67phox Have Distinct Roles in the Regulation of Electron Flow in NADPH Oxidase,» *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 6543-6548, 1995.
- [107] M. Rossmann, D. Moras et K. Olsen, «Chemical and biological evolution of a nucleotide binding protein,» *Nature*, vol. 250, pp. 194-199, 1974.
- [108] M. V. C. Nguyen, B. Lardy, M.-H. Paclet, F. Rousset, S. Berthier, A. Baillet, L. Grange, P. Gaudin et F. Morel, «NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family,» *Med. Sci.*, vol. 31, pp. 43 - 52, 2015.
- [109] F. Magnani et A. Mattevi, «Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH Oxidases,» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 59, p. 91–97, 2019.
- [110] J. Doussi re, J. Gaillard et P. V. Vignais, «Electron Transfer Across the O₂- Generating Flavocytochrome b of Neutrophils. Evidence for a Transition from a Low-Spin State to a High-Spin State of the Heme Iron Component,» *Biochemistry*, vol. 35, pp. 13400-13410, 1996.
- [111] P. V. Vignais, «The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism,» *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, vol. 59, p. 1428–1459, 2002.
- [112] V. Koshkin, «Spatial and electrogenic properties of superoxide-producing cytochrome b-559 incorporated into liposomes,» *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1229, pp. 329-333, 1995.
- [113] A. R. Cross, J. F. Parkinson et O. T. G. Jones, «Mechanism of the superoxide-producing oxidase of neutrophils,» *Biochem. J.*, vol. 226, pp. 881-884, 1985.
- [114] M. Ceccon, E. M. Fananas, M. Massari, A. Mattevi et F. Magnani, «Engineering stability in NADPH oxidases: A common strategy for enzyme production,» *Molecular Membrane Biology*, vol. 34, pp. 67-76, 2017.
- [115] A. W. Segal, «Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease,» *Nature*, vol. 326, p. 88–91, 1987.
- [116] D. N. Meijles, Brendan, J. Howlin et J.-M. Li, «Consensus in silico computational modelling of the p22phox subunit of the NADPH oxidase,» *Computational Biology and Chemistry*, vol. 39, p. 6–13, 2012.
- [117] Y. Groemping, K. Lapouge, S. Smerdon et K. Rittinger, «Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase,» *Cell*, vol. 113, p. 343–355, 2003.

- [118] K. Ogura, I. Nobuhisa, S. Yuzawa, R. Takeya, S. Torikai, K. Saikawa, H. Sumimoto et F. Inagaki, «NMR solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox complexed with a p22phox-derived proline-rich peptide,» *J. Biol. Chem.*, vol. 281, p. 3660–3668, 2006.
- [119] H. Sumimoto, «Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species,» *FEBS Journal*, vol. 275, p. 3249–3277, 2008.
- [120] C. S. Ziegler, L. Bouchab, M. Tramier, D. Durand, F. Fieschi, S. Dupré-Crochet, F. Mérola, O. Nüße et M. Erard, «Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase,» *In press*, 2019.
- [121] J. Marcoux, P. Man, I. Petit-Haertlein, C. Vivès, E. Forest et a. F. Fieschi, «p47phox Molecular Activation for Assembly of the Neutrophil NADPH Oxidase Complex,» *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 28980-28990, 2010.
- [122] V. Koshkin, O. Lotan et E. Pick, «The Cytosolic Component p47phox Is Not a Sine Qua Non Participant in the Activation of NADPH Oxidase but Is Required for Optimal Superoxide Production,» *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 30326-30329, 1996.
- [123] K. Miyano, N. Ueno, R. Takeya et H. Sumimoto, «Direct Involvement of the Small GTPase Rac in Activation of the Superoxide-producing NADPH Oxidase Nox1,» *J. Biol. Chem.*, vol. 281, pp. 21857-21868, 2006.
- [124] S. Grizot, J. Fauré, F. Fieschi, P. Vignais, M. Dagher et E. Pebay-Peyroula, «Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation,» *Biochemistry*, vol. 40, pp. 10007-10013, 2001 .
- [125] Y. Nisimoto, H. Ogawa, K. Miyano et M. and Tamura, «Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex,» *Biochemistry*, vol. 43, pp. 9567-9575, 2004.
- [126] M. T. Quinn et K. A. Gauss, «Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases,» *J. Leuk. Biol.*, vol. 76, pp. 760-781, 2004.
- [127] T. Gabig, C. Crean, P. Mantel et R. Rosli, «Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation,» *Blood*, vol. 85, pp. 804-811, 1995.
- [128] G. Nguyen, E. Green et s. J. Mecska, «Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance,» *Front Cell Infect. Microbiol.*, vol. 25, pp. 373-397, 2017.
- [129] C.-S. Yang, J. o.-S. Lee, M. Rodgers, C.-K. Min, J.-Y. Lee et H. J. Kim, «Autophagy Protein Rubicon Mediates Phagocytic NADPH Oxidase Activation in Response to Microbial Infection or TLR Stimulation,» *Cell Host & Microbe*, vol. 11, pp. 264-276, 2012.
- [130] F. DeLeo, L. Allen, W. Apicella et M. Nauseef, «NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis,» *J. Immunol.*, vol. 163, pp. 6732-6740, 1999.

- [131] J. Si, J. Behar, J. Wands, D. G. Beer, D. Lambeth, Y. E. Chin et W. Cao, «STAT5 Mediates Platelet-Activating Factor (PAF)-Induced NADPH Oxidase NOX5-S Expression In Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells,» *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, pp. 1-39, 2007.
- [132] J. Bylund, M. Samuelsson, L. Collins et A. Karlsson, «NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors,» *Exp. Cell. Res.*, vol. 282, pp. 70-77, 2003.
- [133] Y.-S. Kim, M. J. Morgan, S. Choksi et Z. h.-g. Liu, «TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death,» *Mol. Cell*, vol. 26, pp. 675-687, 2007.
- [134] T. Ago, H. Nuno, T. Ito et H. Sumimoto, «Mechanism for Phosphorylation-induced Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase Protein p47 phox,» *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 33644–33653, 1999.
- [135] J. El Benna, L. P. Faust et B. M. & Babior, «The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47(phox) during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases,» *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 23431-23436, 1994.
- [136] O. Inanami, J. L. Johnson, J. K. McAdara, J. El Benna, L. R. P. Faust, P. E. Newburger et B. M. Babior, «Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47(PHOX) on serine 303 or 304,» *J. Biol. Chem.*, vol. 273, p. 9539–9543, 1998.
- [137] O. Inanami, J. L. Johnson, J. K. McAdara, J. El Benna et L. R. P. Faust, «Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase,» *Blood*, vol. 116, pp. 6026-6036, 2010.
- [138] P. Dang, A. Stensballe, T. Boussetta, H. Raad, C. Dewas, Y. Kroviarski et J. El-Benna, «A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites,» *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, pp. 2033-2043, 2006.
- [139] S. Beaumel, A. Picciocchi, F. Debeurme, C. Vives et A.-M. Hesse, «Down-regulation of NOX2 activity in phagocytes mediated by ATM-kinase dependent phosphorylation,» *Free Radic. Biol. Med. Dec.*, vol. 113, p. 1–15., 2017 .
- [140] P. Nunes, N. Demareux et M. Dinuer, «Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis,» *Traffic*, vol. 14, p. 1118–1131, 2013.
- [141] A. Sellmayer, H. Obermeier, U. Danesch, M. Aepfelbacher et P. C. Weber, «Arachidonic acid increases activation of NADPH oxidase in monocytic U937 cells by accelerated translocation of p47-phox and co-stimulation of protein kinase C.,» *Cellular Signalling*, vol. 8, p. 397–402, 1996.
- [142] T. Bizouarn, G. Karimi, R. Masoud, H. Souabni, P. Machillot et X. Serfaty, «Exploring the arachidonic acid-induced structural changes in phagocyte NADPH oxidase p47phox and

- p67phox via thiol accessibility and SRCD spectroscopy,» *The FEBS Journal*, vol. 283, p. 2896–2910, 2016.
- [143] R. Matono, K. Miyano, T. Kiyohara et H. Sumimoto, «Arachidonic Acid Induces Direct Interaction of the p67phox-Rac Complex with the Phagocyte Oxidase Nox2, Leading to Superoxide Production,» *J. Biol. Chem.*, vol. 289, pp. 24874-24884, 2014.
- [144] R. Takeya, N. Ueno, K. Kami et M. Taura, «Novel Human Homologues of p47phox and p67phox Participate in Activation of Superoxide-producing NADPH Oxidases,» *J. Biol. Chem.*, vol. 278, pp. 25234-25246, 2003.
- [145] Y. Nisimoto, H. M. Jackson, H. Ogawa, T. Kawahara et J. D. Lambeth, «Constitutive NADPH-Dependent Electron Transferase Activity of the Nox4 Dehydrogenase Domain,» *Biochemistry*, vol. 49, p. 2433–2442, 2010 .
- [146] A. N. Lyle, N. N. Deshpande, Y. Taniyama et B. Seidel-Rogol, «Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells,» *Circ. Res.*, vol. 105, p. 249–259, 2009 .
- [147] I. Takac, K. Schröder, L. Zhang, B. Lardy, N. Anilkumar et J. D. Lambeth, «The E-loop Is Involved in Hydrogen Peroxide Formation by the NADPH Oxidase Nox4,» *J. Biol. Chem.*, vol. 286, p. 13304–13313, 2011.
- [148] T. Kawahara, H. M. Jackson, S. M. Smith, P. D. Simpson et J. D. Lambeth, «Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain,» *Biochemistry*, vol. 50, p. 2013–2025, 2011.
- [149] D. Chin et A. Means, *Trends Cell Biol.*, vol. 10, pp. 322-328, 2000.
- [150] C.-C. Wei, N. Reynolds, C. Palka, K. Wetherell, T. Boyle et Y.-P. Yang, «Characterization of the 1st and 2nd EF-hands of NADPH oxidase 5 by fluorescence, isothermal titration calorimetry, and circular dichroism,» *Chemistry Central Journal*, vol. 6, pp. 1-11, 2012.
- [151] T. Kiyohara, K. Miyano, S. Kamakura, J. Hayase, K. Chishiki, A. Kohda et H. Sumimoto, «Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2 and Nox5: The role of the small GTPase Sar1,» *Genes to Cells*, vol. 23, p. 480–493, 2018.
- [152] M. Milenkovic, X. De Deken, L. Jin, D. F. M., R. Di Lauro, J. Dumont, B. Corvilain et M. F., «Duox expression and related H₂O₂ measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult,» *J. Endocrinol.*, vol. 192, pp. 615-626, 2007 .
- [153] A. Levine et A. Segal, «The NADPH Oxidase and Microbial Killing by Neutrophils, With a Particular Emphasis on the Proposed Antimicrobial Role of Myeloperoxidase within the Phagocytic Vacuole,» *Microbiol Spectr.*, vol. 4, pp. 1-14, 2016 .
- [154] B. Rada et T. L. Leto, «Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH Oxidases,» *Contrib Microbiol.*, vol. 15, p. 164–187., 2008.

- [155] L. Chen et C. Jan, «Mechanisms and modulation of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced Ca²⁺ mobilization in human neutrophils,» *International Immunopharmacology*, vol. 1, p. 1341–1349, 2001.
- [156] J. E. McInturff, R. L. Modlin et J. Kim, «The Role of Toll-like Receptors in the Pathogenesis and Treatment of Dermatological Disease,» *The Journal of investigative dermatology*, vol. 125, p. 1–8, 2005.
- [157] L. Henderson, J. Chappell et O. Jones, «The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel,» *Biochem. J.*, vol. 246, pp. 325–9, 1987 .
- [158] J. Schrenzel, L. Serrander, B. Bánfi, O. Nüße, R. Fouyouzi, D. P. Lew, N. Demaurex et K.-H. Krause, «Electron currents generated by the human phagocyte NADPH oxidase,» *Nature*, vol. 392, pp. 734–7, 1998 .
- [159] T. E. DeCoursey, «The Intimate and Controversial Relationship between Voltage,» *Immunol. Rev.*, vol. 273, p. 194–218, 2016 .
- [160] M. Capasso, T. E. DeCoursey et M. J. Dyer, «pH regulation and beyond: unanticipated functions for the voltage-gated proton channel, HVCN1,» *Trends in Cell Biology*, vol. 21, pp. 20–28, 2011.
- [161] E. P. Reeves, «Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux,» *Nature* , vol. 416, p. 291–297, 2002.
- [162] A. W. Segal, «The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals,» *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 40 , p. 604–618, 2008.
- [163] J. M. Rothfork, G. S. Timmins, M. N. Harris, X. Chen et al, «Inactivation of a bacterial virulence pheromone by phagocyte-derived oxidants: New role for the NADPH oxidase in host defense,» *PNAS*, vol. 101 , p. 13867–13872, 2004 .
- [164] M. Dupont, A. Ouachée, J. Royer et C. Dupuy, «NADPH oxydase Agent double dans l’inflammation ?,» *Med. Sci.*, vol. 10, pp. 833–835, 2016.
- [165] S. V. Kumar, O. P. Kulkarni, S. R. Mulay, M. N. Darisipudi et al, «Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN,» *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 26, p. 2399–2413, 2015.
- [166] V. Granger, L. d. Chaisemartin et S. Chollet-Martin, «La pêche miraculeuse du neutrophile,» *Med. Sci.*, vol. 30 , pp. 544–49, 2014 .
- [167] M. Bianchi, A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler et al, «Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis,» *Blood*, vol. 114, pp. 2619–2622, 2009.
- [168] M. Röhm, M. J. Grimm, A. C. D’Auria, N. G. Almyroudís, B. H. Segal et C. F. Urban, «NADPH Oxidase Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pulmonary Aspergillosis,» *Infection and Immunity*, vol. 82, p. 1766–1777, 2014 .

- [169] T. Hunter, «Signaling : 2000 and Beyond,» *Cell*, vol. 100, p. 113–127, 2000.
- [170] D. Barford, «The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches,» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 14, p. 679–686, 2004.
- [171] A. Salmeen et D. Barford, «Functions and Mechanisms of Redox Regulation of Cysteine-Based Phosphatases,» *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, vol. 7, pp. 560-570, 2005.
- [172] J. M. Denu et K. G. Tanner, «Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation,» *Biochemistry*, vol. 37, pp. 5633-5642, 1998.
- [173] B. J. Goldstein, M. Kalyankar et X. Wu, «Redox Paradox: Insulin Action Is Facilitated by Insulin-Stimulated Reactive Oxygen Species With Multiple Potential Signaling Targets,» *Diabetes*, vol. 54, p. 311–321, 2005 .
- [174] J. Kwon, C.-K. Qu, J.-S. Maeng, R. Falahati, C. Lee et M. S. Williams, «Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76–ADAP,» *The EMBO Journal*, vol. 24, p. 2331–2341, 2005.
- [175] M.-J. Han, B.-Y. Kim, S.-O. Yoon et A.-S. Chung, «Cell Proliferation Induced by Reactive Oxygen Species Is Mediated via Mitogen-activated Protein Kinase in Chinese Hamster Lung Fibroblast (V79) Cells,» *Mol. Cells*, vol. 15, pp. 94-101 , 2003.
- [176] R. Fürst, C. Brueckl, W. M. Kuebler, S. Zahle et al, «Atrial Natriuretic Peptide Induces Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Human Endothelial Cells via Rac1 and NAD(P)H Oxidase/Nox2-Activation,» *Circulation Research*, vol. 7, pp. 43-53, 2005.
- [177] J. Li, M. Stouffs, L. Serrander et B. Banfi, «The NADPH Oxidase NOX4 Drives Cardiac Differentiation: Role in Regulating Cardiac Transcription Factors and MAP Kinase Activation,» *Mol. Biol. Cell.*, vol. 17, p. 3978–3988, 2006 .
- [178] A. Görlach, K. Bertram, S. Hudecova et O. Krizanova, «Calcium and ROS: A mutual interplay,» *Redox Biology*, vol. 6, p. 260–271, 2015.
- [179] C. X. Santos, N. Anilkumar, M. Zhang, A. C. Brewer et A. M. Shah, «Redox signaling in cardiac myocytes,» *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 50, p. 777–793, 2011 .
- [180] Y. Wang, X. Deng, T. Hewavitharana, J. Soboloff et D. L. Gill, «STIM, ORAI and TRPC Channels in the Control of Calcium Entry Signals in Smooth Muscle,» *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 35, p. 1127–1133, 2008.
- [181] N. Weissmann, A. Sydykov, H. Kalwa, U. Storch et B. Fuchs, «Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia–reperfusion induced oedema in mice,» *Nature Communications*, vol. 3, pp. 1-10, 2012.
- [182] M. Grupe, G. Myers, R. Penner et A. Fleig, «Activation of store-operated ICRCAC by hydrogen peroxide,» *Cell Calcium*, vol. 48, p. 1–9, 2010.

- [183] M. P. Granados, G. M. Salido, A. González et J. A. Pariente, «Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells,» *Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 84, pp. 39-48, 2006.
- [184] X. Wang, S. Takeda, S. Mochizuki, R. Jindal et N. S. Dhalla, «Mechanisms of Hydrogen Peroxide-Induced Increase in Intracellular Calcium in Cardiomyocytes,» *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.*, vol. 4, pp. 41-48, 1999.
- [185] G. Liu et I. N. Pessah, «Molecular Interaction between Ryanodine Receptor and Molecular Interaction between Ryanodine Receptor and Glycoprotein Triadin Involves Redox Cycling of Functionally Important Hyperreactive Sulfhydryls,» *J. Bio. Chem.*, vol. 269, pp. 33028-33034, 1994 .
- [186] T. Favero, A. Zable et J. Abramson, «Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 270, p. 25557–25563, 1995.
- [187] Y. Suzuki, L. Cleemann, D. Abernethy et M. Morad, «Glutathione is a cofactor for H₂O₂-mediated stimulation of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac myocytes,» *Free Radical Biol. Med.*, vol. 24, p. 318–325, 1998.
- [188] M. Kawakami et E. Okabe, «Superoxide anion radical-triggered Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca²⁺ channel,» *Mol. Pharmacol.*, vol. 53, p. 497–503, 1998.
- [189] S. Cheranov et J. Jaggar, «TNF- α dilates cerebral arteries via NAD(P)H oxidase-dependent Ca²⁺ spark activation,» *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, vol. 290, p. C964–C971, 2006.
- [190] C. Hidalgo, G. Sanchez, G. Barrientos et P. Aracena-Parks, « A transverse tubule NOX activity stimulates calcium release from isolated triads via RYR1 S-glutathionylation,» *J. Biol. Chem.*, vol. 281, pp. 26473-82, 2006.
- [191] X.-Y. Yi, V. X. Li, F. Zhang, F. Yi, D. R. Matson, M. T. Jiang et P.-L. Li, «Characteristics and actions of NAD(P)H oxidase on the sarcoplasmic reticulum of coronary artery smooth muscle,» *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 290, p. H1136 –H1144, 2006.
- [192] Q. Hu, Y. Zu-Xi, V. J. Ferrans, K. Takeda, K. Irani et R. C. Ziegelstein, «Critical Role of NADPH Oxidase-derived Reactive Oxygen Species in Generating Ca²⁺ Oscillations in Human Aortic Endothelial Cells Stimulated by Histamine,» *J. Bio. Chem.*, vol. 277, p. 32546–32551, 2002.
- [193] T. Adachi, R. M. Weisbrod, D. R. Pimentel, J. Ying et al, «S-Glutathionylation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide,» *Nature Medicine*, vol. 10, p. 1200–1207, 2004.
- [194] P. C. Redondo, G. M. Salido, J. A. Rosado et J. A. Pariente, «Effect of hydrogen peroxide on Ca²⁺ mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms,» *Biochemical Pharmacology*, vol. 67, pp. 491-502, 2004.
- [195] K. Irani, «Oxidant Signaling in Vascular Cell Growth, Death, and Survival : A Review of the Roles of Reactive Oxygen Species in Smooth Muscle and Endothelial Cell Mitogenic and Apoptotic Signaling,» *Circ. Res.*, vol. 87, pp. 179-183, 2000.

- [196] M. B. Hampton, B. Fadeel et S. Orrenius, «Redox Regulation of the Caspases during Apoptosis,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 854, p. 328–335, 1997.
- [197] M. B. Hampton et S. Orrenius, «Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis,» *FEBS Letters*, vol. 414, pp. 552–555, 1997.
- [198] S. S. Deshpande, P. Angkeow et J. Huang, «Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis,» *The FASEB Journal*, vol. 14, p. 1705–1714, 2000.
- [199] T. Mochizuki, S. Furuta, J. Mitsushita, W. H. Shang, M. Ito, Y. Yokoo, M. Yamaura, S. Ishizone, J. Nakayama, A. Konagai, K. Hirose, K. Kiyosawa et T. Kamata, «Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells,» *Oncogene*, vol. 25, p. 3699–3707, 2006.
- [200] M. Clement et I. Stamenkovic, «Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death,» *EMBO J.*, vol. 15, p. 216–225, 1996.
- [201] T. Adachi, H. Togashi, A. Suzuki, S. Kasai, J. Ito, K. Sugahara et S. Kawata, «NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells,» *Hepatology*, vol. 41, pp. 1272–1281, 2005.
- [202] K. Irani, Y. Xia, J. L. Zweier, S. J. Sollott et al, «Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts,» *Science*, vol. 275, pp. 1649–1652, 1997.
- [203] A. Laurent, C. Nicco, C. Chéreau et C. Goulvestre, «Controlling Tumor Growth by Modulating Endogenous Production of Reactive Oxygen Species,» *Cancer Res.*, vol. 65, pp. 948–956, 2005.
- [204] R. S. Arnold, J. Shi, E. Murad, A. M. Whalen et al, «Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, p. 5550–5555, 2001.
- [205] X. Fu, D. G. Beer, J. Behar, J. Wands, D. Lambeth et W. Cao, «cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells,» *J. Bio Chem.*, vol. 281, p. 20368–20382, 2006.
- [206] J. C. Moreno, H. Bikker, M. J. Kempers et P. v. Trotsenburg, «Inactivating Mutations in the Gene for Thyroid Oxidase(THOX2) and Congenital Hypothyroidism,» *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, pp. 95–10, 2002.
- [207] B. Banfi, B. Malgrange, J. Knisz, K. Steger, M. Dubois-Dauphin et K. Krause, «NOX3: a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear,» *J. Biol. Chem.*, vol. 279, p. 46065–46072, 2004.
- [208] V. Malec, O. R. Gottschald, S. Li, F. Rose, W. Seeger et J. Hänze, «HIF-1 α signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells,» *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 48, p. 1626–1635, 2010.
- [209] H. Wang, Z. Yang, Y. Jiang et M. Hartnett, «Endothelial NADPH oxidase 4 mediates vascular endothelial growth factor receptor 2-induced intravitreal neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity,» *Mol. Vis.*, vol. 20, p. 231–241, 2014.

- [210] B. Di Bartolo, S. Cartland, L. Prado-Lourenco, T. Griffith, C. Gentile et al, «Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail) promotes angiogenesis and ischemia-induced neovascularization via NADPH oxidase 4 (NOX4) and nitric oxide-dependent mechanisms.,» *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 4, p. e002527, 2015.
- [211] H. Peshavariya, E. Chan, G. Liu, F. Jiang et G. Dusting, «Transforming growth factor- β 1 requires NADPH oxidase 4 for angiogenesis in vitro and in vivo,» *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 18, p. 1172–1183, 2014.
- [212] L. Chen, J. Xiao, J. Kuroda, T. Ago, J. Sadoshima, R. Cohen et X. Tong, «Both hydrogen peroxide and transforming growth factor β 1 contribute to endothelial Nox4 mediated angiogenesis in endothelial Nox4 transgenic mouse lines,» *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1842, p. 2489–2499, 2014.
- [213] E. Shafique, A. Torina, K. Reichert, B. Colantuono, N. N. et al, «Mitochondrial redox plays a critical role in the paradoxical effects of NADPH oxidase-derived ROS on coronary endothelium,» *Cardiovasc. Res.*, vol. 113, p. 234–246, 2017.
- [214] A. Evangelista, M. Thompson, V. Bolotina, X. Tong et R. Cohen, «Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 s-glutathiolation and endothelial cell migration,» *Free Rad. Biol. Med.*, vol. 53, p. 2327–2334, 2012.
- [215] S. Craige, K. Chen, Y. Pei, C. Li, X. Huang, C. Chen, R. Shibata, K. Sato, K. Walsh et J. Keaney, «NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation,» *Circulation*, vol. 124, p. 731–740, 2011.
- [216] S. Garrido-Urbani, S. Jemelin, C. Deffert, S. Carnesecchi, O. Basset, C. Szyndralewicz, F. Heitz, P. Page, X. Montet, L. Michalik et al., «Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPAR α mediated mechanism,» *PLoS ONE*, vol. 6, p. 14665, 2011.
- [217] H. Menden, S. Welak, S. Cossette, R. Ramchandran et V. Sampath, «Lipopolysaccharide (LPS)-mediated angiopoietin-2-dependent autocrine angiogenesis is regulated by NADPH oxidase 2 (Nox2) in human pulmonary microvascular endothelial cells,» *J. Biol. Chem.*, vol. 290, pp. 5449-5461, 2015 .
- [218] T. Ho, J. Tsui, S. Xu, P. Leoni, D. Abraham et D. Baker, «Angiogenic effects of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) variants in vitro and the in vivo expressions of CXCL12 variants and CXCR4 in human critical leg ischemia.,» *J. Vasc. Surg.*, vol. 51, p. 689–699, 2010.
- [219] X. Pi, L. Xie, A. Portbury, S. Kumar, P. Lockyer, L. X. et C. Patterson, «NADPH oxidase-generated reactive oxygen species are required for stromal cell-derived factor-1 α -stimulated angiogenesis,» *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, p. 2023–2032, 2014.
- [220] I. Kramer, A. Verhoeven, R. Van Der Bend, R. Weening et D. Roos, «Purified protein kinase C phosphorylates a 47-kDa protein in control neutrophil cytoplasts but not in neutrophil cytoplasts from patients with the autosomal form of chronic granulomatous disease.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 263, p. 2352–2357, 1988.

- [221] A. Panday, M. K. Sahoo, D. Osorio et S. Batra, «NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies,» *Cellular & Molecular Immunology*, vol. 12, p. 5–23, 2015.
- [222] M. Stasia, P. Cathebras, M. Lutz et I. Durieu, «Chronic-granulomatous disease,» *La Revue de médecine interne*, vol. 30, p. 221–232, 2009.
- [223] A. Popa-Wagner, S. Mitran, S. Sivanesan, E. Chang et A. Buga, «ROS and brain diseases: The good, the bad, and the ugly,» *Oxid. Med. Cell. Longevity*, vol. 2013, p. 963520, 2013.
- [224] K. Sorce et S. Krause, «NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease,» *Antioxid Redox Signal*, vol. 11, p. 2481–2504, 2009.
- [225] C. Chéret, A. Gervais, A. Lelli, C. Colin, L. Amar, P. Ravassard, J. Mallet, A. Cumano, K. Krause et M. Mallat, «Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase,» *J. Neurosci.*, vol. 12, pp. 12039-51, 2008 .
- [226] B. Li, K. Bedard, S. Sorce, B. Hinz, M. Dubois-Dauphin et K. Krause, «NOX4 expression in human microglia leads to constitutive generation of reactive oxygen species and to constitutive IL-6 expression,» *J. Innate. Immun.*, vol. 1, pp. 570-81, 2009.
- [227] H. Yao, T. Ago, T. Kitazono et T. Nabika, «NADPH Oxidase-Related Pathophysiology in Experimental Models of Stroke,» *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, p. 2123, 2017 .
- [228] K. Belarbi, E. Cuvelier, A. Destée, B. Gressier et M.-C. Chartier-Harlin, «NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review,» *Belarbi et al. Molecular Neurodegeneration*, vol. 12, pp. 1-18, 2017.
- [229] M. S. Hernandez et L. R. G. Britto, «NADPH Oxidase and Neurodegeneration,» *Current Neuropharmacology*, vol. 10, pp. 321-327, 2012.
- [230] J. George, S. Mok, D. Moses, S. Wilkins, A. Bush, R. Cherny et D. Finkelstein, «Targeting the Progression of Parkinson's Disease,» *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 7, p. 9–36, 2009 .
- [231] S. Huh, Y. Chung Y.C., Piao, M. Jin, H. Son, N. Yoon, J. Hong, Y. Pak, Y. Kim, J. Hong, O. Hwang et B. Jin, «Ethyl pyruvate rescues nigrostriatal dopaminergic neurons by regulating glial activation in a mouse model of Parkinson's disease,» *J. Immunol.*, vol. 187, pp. 960-9, 2011 .
- [232] Hernandez, M.S., Café-Mendes, C.C. et L. Britto, «NADPH oxidase and the degeneration of dopaminergic neurons in parkinsonian mice.,» *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2013, p. 157857, 2013.
- [233] J. Rodriguez-Pallares, P. Rey, J. Parga, A. Muñoz, M. Guerra et J. Labandeira-Garcia, «Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS,» *Neurobiol. Dis.*, vol. 31, pp. 58-73, 2008.
- [234] S. Kim, J. Hwang, W. Lee, D. Hwang et K. Suk, «Role of protein kinase in paraquat-induced glial cell death,» *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, pp. 2062-2070, 2008.
- [235] S. Shimohama, H. Tanino, N. Kawakami, N. Okamura, H. Kodama, T. Yamaguchi, T. Hayakawa, A. Nunomura, S. Chiba, G. Perry, M. A. Smith et S. Fujimoto, «Activation of NADPH Oxidase in

Alzheimer's Disease Brains,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 273, p. 5–9, 2000.

- [236] L. Park, P. Zhou, R. Pitstick, C. Capone, J. Anrather, E. H. Norris, L. Younkin, S. Younkin, G. Carlson, B. S. McEwen et C. Iadecola, «Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Jan 29;*, vol. 105, p. 1347–1352, 2008 .
- [237] P. Gamba et al, «Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime,» *Aging Cell*, vol. 10, p. 403–417, 2011.
- [238] A. J. Bruce-Keller, S. Gupta, A. G. Knight, T. L. Beckett, J. M. McMullen, P. R. Davis, M. P. Murphy, L. J. V. Eldik, D. S. Clair et J. N. Keller, «Cognitive Impairment in Humanized APPxPS1 Mice is Linked to A β 1-42 and NOX Activation,» *Neurobiol. Dis.*, vol. 44, p. 317–326, 2011 .
- [239] P. I. Moreirax et C. Oliveiray, «Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease,» *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 9, pp. 167-181, 2006.
- [240] D.-H. Choi, K.-H. Lee, J.-H. Kim, J.-H. Seo, H. Y. Kim et C. Y. Shin, «NADPH Oxidase 1, a Novel Molecular Source of ROS in Hippocampal Neuronal Death in Vascular Dementia,» *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 21, 2014.
- [241] J. L. Meitzler, S. Antony, Y. Wu, A. Juhasz, H. Liu, G. Jiang, J. Lu, K. Roy et J. H. Doroshow, «NADPH Oxidases: A Perspective on Reactive Oxygen Species Production in Tumor Biology,» *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, vol. 20, pp. 2873-2888, 2014.
- [242] A. Juhasz, Y. Ge, S. Markel, A. Chiu, L. Matsumoto, J. Van Balgooy, K. Roy et D. J. , «Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues.,» *Free Radic Res.*, vol. 43, pp. 523-532, 2009 .
- [243] M. Skonieczna, T. Hejmo, A. Poterala-Hejmo, A. Cieslar-Pobuda et R. J. Buldak, «NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells,» *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, pp. 1-15, 2017.
- [244] R. M. Daya et Y. J. Suzukib, «Cell Proliferation, Reactive Oxygen and Cellular Glutathione,» *Dose Response*, vol. 3, p. 425–442, 2005.
- [245] P. Wang, Q. Shi, W.-H. Deng, J. Yu, T. Zuo, F.-C. Mei et W.-X. Wang, «Relationship between expression of NADPH oxidase 2 and invasion and prognosis of human gastric cancer,» *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, p. 6271–6279, 2015 .
- [246] J.-G. Ren, H.-L. Xia, T. Just et Y.-R. Dai, «Hydroxyl radical-induced apoptosis in human tumor cells is associated with telomere shortening but not telomerase inhibition and caspase activation,» *FEBS Letters*, vol. 488, pp. 123-132, 2001.
- [247] T. Matura, M. Kai, Y. Fujii, H. Ito et K. Yamada, «Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation,» *Free Rad. Res.*, vol. 30, pp. 73-83 , 1999.

- [248] S. Simizu, M. Takada, K. Umezawa et M. Imoto, «Requirement of Caspase-3(-like) Protease-mediated Hydrogen Peroxide Production for Apoptosis Induced by Various Anticancer Drugs,» *J. Bio. Chem.*, vol. 273, p. 26900–26907, 1998.
- [249] K. Graham, M. Kulawiec, K. Owens, X. Li, M. Desouki, D. Chandra et K. Singh, «NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria,» *Cancer Biol. Ther.*, vol. 10, pp. 223-231, 2010 .
- [250] T. Ago, J. Kuroda, J. Pain, C. Fu, H. Li et J. Sadoshima, «Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes,» *Circ. Res. Apr 16;(7);*, vol. 106, pp. 1253-1264, 2010 .
- [251] G. Kartha, K. Moshal, U. Sen, I. Joshua, N. Tyagi, M. Steed et S. Tyagi, «Renal mitochondrial damage and protein modification in type-2 diabetes,» *Acta Diabetol.*, vol. 45, pp. 75-81, 2008 .
- [252] N. Y. Spencer, Z. Yan, R. L. Boudreau, Y. Zhang, M. Luo, Q. Li, X. Tian, A. M. Shah, R. L. Davisson, B. Davidson, B. Banfi et J. F. Engelhardt, «Control of Hepatic Nuclear Superoxide Production by Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase and NADPH Oxidase-4,» *J. Biol. Chem.*, vol. 286, p. 8977–8987, 2011 .
- [253] H. Vaziri, I. S. K. Dessain, E. N. Eaton, S.-I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente et R. A. Weinberg, «hSIR2/SIRT1 Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase,» *Cell*, vol. 107, p. 149–159, 2001.
- [254] J. P. Thiery, «Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies,» *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 15, p. 740–746, 2003.
- [255] H. S. Leong, A. E. Robertson, K. Stoletov et al, «Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis,» *Cell Reports*, vol. 8, p. 1558–1570, 2014.
- [256] B. Diaz, G. Shani, D. A. Ian Pass, M. Quintavalle et S. A. Courtneidge, «Tks5-dependent, Nox-mediated Generation of Reactive Oxygen Species is Necessary for Invadopodia Formation,» *Sci Signal*, vol. 2, pp. 1-15, 2009 .
- [257] F. v. Zijl, G. Krupitza et W. Mikulits, «Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration,» *Mutation Research*, vol. 728, p. 23–34, 2011.
- [258] H. Paz, N. Pathak et J. Yang, «Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis,» *Oncogene*, vol. 33, p. 4193–4202, 2014..
- [259] P. Lock, C. Abram, T. Gibson et S. Courtneidge, «A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate,» *EMBO J.*, vol. 17, pp. 4346-57, 1998 .
- [260] H. S. Leong, A. E. Robertson, K. Stoletov et al, «Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity,» *Science Signaling*, vol. 2, 2009.
- [261] D. F. Seals, F. A. Jr. Eduardo, I. Pass et al, «The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells,» *Cancer Cell*, vol. 7, pp. 155-165, 2005.

- [262] O.-Y. Revach, O. Sandler, Y. Samuels et B. Geiger, «Cross-talk between receptor tyrosine kinases AXL and ERBB3 regulates invadopodia formation in melanoma cells,» *Cancer Res.*, 2019.
- [263] L. X., C. Pei, S. Yan, G. Liu, G. Liu, W. Chen, Y. Cui et Y. Liu, «NADPH oxidase 1-dependent ROS is crucial for TLR4 signaling to promote tumor metastasis of non-small cell lung cancer,» *Tumour Biol.*, vol. 36, pp. 1493-502, 2015 .
- [264] H.-S. Huang, Z.-M. Liu, P.-C. Chen, Hong-YuTseng et Bi-WenYeh, «TG-interacting factor-induced superoxide production from NADPH oxidase contributes to the migration/invasion of urothelial carcinoma,» *Free. Radic. Biol. Med.*, vol. 53, pp. 769-78, 2012.
- [265] N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura et M. Kojiro, «Angiogenesis in cancer,» *Vascular Health and Risk Management*, vol. 2, p. 213–219, 2006.
- [266] V. Helfinger, N. Henke, S. Harenkamp et al, «The NADPH oxidase Nox4 mediates tumour angiogenesis,» *Acta Physiologica*, vol. 216, pp. 435–446,, 2016..
- [267] S. N. Jung, W. K. Yang, J. Kim et al, «Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells,» *Carcinogenesis*, vol. 29, p. 713–721, 2008.
- [268] K. Block et Y. Gorin, «Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation,»,» *Nature Reviews, Cancer*, vol. 12, p. 627–637, 2012.
- [269] C. Xia, Q. Meng, L. Liu, Y. Rojanasakul, X. Wang et J. B. , «Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor,» *Cancer Res.*, vol. 67, pp. 10823-30, 2007 .
- [270] J. L. Arbiser, J. Petros, R. Klafter et al, «Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, p. 715–720, 2002 .
- [271] A. Konior, A. Schramm, M. Czesnikiewicz-Guzik et T. J. Guzik, «NADPH Oxidases in Vascular Pathology,» *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, vol. 20, p. 17, 2014.
- [272] S. Rajagopalan, S. Kurz, T. Münzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling et D. G. Harrison, «Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone,» *J. Clin. Invest.*, vol. 97, p. 1916–1923, 1996.
- [273] T. J. Guzik, S. Mussa, D. Gastaldi, J. Sadowski, C. Ratnatunga, R. Pillai et K. M. Channon, «Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase.,» *Circulation*, vol. 105, pp. 1656-62, 2002.
- [274] A. Dikalova, R. Clempus, B. Lassègue et al, «Nox1 Overexpression Potentiates Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Smooth Muscle Hypertrophy in Transgenic Mice,» *Circulation*, vol. 112, p. 2668–2676, 2005.

- [275] U. Landmesser, H. Cai, S. Dikalov et al, «Role of p47phox in Vascular Oxidative Stress and Hypertension Caused by Angiotensin II,» *Hypertension*, vol. 40, p. 511–515, 2002 .
- [276] U. Landmesser, S. Dikalov et S. R. Price, «Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension,» *J. Clin. Invest.*, vol. 111, p. 1201–1209, 2003 .
- [277] U. Landmesser, S. Dikalov et S. R. Price, «Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase,» *J. Clin. Invest.*, vol. 111, p. 1201–1209, 2003 .
- [278] R. Ray, C. E. Murdoch, M. Wang et C. X. Santos, «Endothelial Nox4 NADPH Oxidase Enhances Vasodilatation and Reduces Blood Pressure In Vivo,» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, p. 1368–1376, 2011.
- [279] K. Schröder, M. Zhang, S. Benkhoff, A. Mieth et al, «Nox4 Is a to suppress,» *Circulation Research*, vol. 110, p. 1217–1225, 2012.
- [280] R. P. Brandes, «Vascular Functions of NADPH Oxidases,» *Hypertension*, vol. 56, p. 17–21, 2010.
- [281] I. Quesada, A. Lucero, C. Amay, a. D. Meijles, M. Cifuentes, P. Pagano et C. Castro, «Selective inactivation of NADPH oxidase 2 causes regression of vascularization and the size and stability of atherosclerotic plaques,» *Atherosclerosis*, vol. 242, p. 469–475, 2015 .
- [282] J. J. Khatri, C. Johnson, R. Magid et S. M. Lessner, «Vascular Oxidant Stress Enhances Progression and Angiogenesis of Experimental Atheroma,» *Circulation*, vol. 109, p. 520–525, 2004.
- [283] M. T. Anderson, F. J. Staal, C. Gitler, L. A. Herzenberg et L. A. Herzenberg, «Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 91, p. 11527–11531, 1994 .
- [284] J. W. Meyer et M. E. Schmitt, «A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis,» *FEBS Letters*, vol. 472 , pp. 1-4, 2000.
- [285] T. J. Guzik, N. E. West, E. Black, D. McDonald, C. Ratnatunga, R. Pillai et K. M. Channon, «Vascular Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase. Association With Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors,» *Circ Res.*, vol. 86, pp. e85-e90, 2000.
- [286] U. Hink, H. Li, H. Mollnau, M. Oelze et al, «Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus,» *Circ Res.*, vol. 8, pp. e14-e22, 2001.
- [287] H. Ding, M. Hashem et C. Triggle, «Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: Changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS,» *European Journal of Pharmacology*, vol. 561 , p. 121–128, 2007.
- [288] C.-F. Liang, J. T. Liu, Y. Wang, A. Xu et P. M. Vanhoutte, «Toll-Like Receptor 4 Mutation Protects Obese Mice Against Endothelial Dysfunction by Decreasing NADPH Oxidase Isoforms 1 and 4,» *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, vol. 33, pp. 777-784, 2013.

- [289] S. P. Gray, E. D. Marco, J. Okabe, C. Szyndralewicz et al, «NADPH Oxidase 1 Plays a Key Role in Diabetes Mellitus–Accelerated Atherosclerosis,» *Circulation*, vol. 127, p. 1888–1902, 2013.
- [290] K. Schröder, K. Wandzioch, I. Helmcke et R. P. Brandes, «Nox4 Acts as a Switch Between Differentiation and Proliferation in Preadipocytes,» *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, vol. 29, pp. 239–245, 2009.
- [291] M.-P. Wautier, O. Chappey, S. Corda, D. M. Stern, A. M. Schmidt et J.-L. Wautier, «Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE,» *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 280, p. E685–E694, 2001.
- [292] W. Taylor, D. Jones et A. Segal, «A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain,» *Protein Sci.*, vol. 2, p. 1675–1685, 1993.
- [293] R. M. Taylor, D. Baniulis, J. B. Burritt, J. M. Gripenrog, C. I. Lord, M. H. Riesselman, W. S. Maaty, B. P. Bothner, T. E. Angel, E. A. Dratz, G. F. Linton, H. L. Malech et A. J. Jesaitis, «Analysis of human phagocyte flavocytochrome b(558) by mass spectrometry,» *Blood*, vol. 85, p. 1104–1110, 2006.
- [294] C. I. Lord, M. H. Riesselman, J. M. Gripenrog, J. B. Burritt, A. J. Jesaitis et R. M. Taylor, «Single-step immunoaffinity purification and functional reconstitution of human phagocyte flavocytochrome b,» *J. Immunol. Methods*, vol. 329, p. 201–207, 2008.
- [295] I. Dahan, I. Issaeva, Y. Gorzalczany, N. Sigal, M. Hirshberg et E. and Pick, «Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by “peptide walking”,» *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 8421–8432, 2002.
- [296] B. Marques, L. Liguori, M. Paclet, A. Villegas-Mendéz, R. Rothe, F. Morel et J. Lenormand, «Liposome-mediated cellular delivery of active gp91(phox).,» *PLoS One*, vol. 2, p. e856, 2007.
- [297] T. M. Wallach et A. W. Segal, «Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro,» *Biochem. J.*, vol. 321, p. 583–585, 1997.
- [298] O. Khow et S. Suntrarachun, «Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system,» *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 2, p. 159–162, 2012.
- [299] M. Lebend et T. Danieli, «Production of prone-to-aggregate proteins,» *FEBS Letters*, vol. 588, pp. 236–246, 2014.
- [300] K. Honbou, R. Minakami, S. Yuzawa, R. Takeya, N. N. Suzuki, S. Kamakura, H. Sumimoto et F. Inagaki, «Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding,» *The EMBO Journal*, vol. 26, p. 1176–1186, 2007.
- [301] T. Ueyama, T. Kusakabe, S. Karasawa, T. Kawasaki, A. Shimizu, J. Son, T. Leto, A. Miyawaki et N. Saito, «Sequential Binding of Cytosolic Phox Complex to Phagosomes through Regulated Adaptor Proteins: Evaluation Using the Novel Monomeric Kusabira-Green System and Live Imaging of Phagocytosis,» *J. Immunol.*, vol. 181, pp. 629–640, 2008 .

- [302] H. Hiroaki, T. Ago, T. Ito, D. Kohda et H. Sumimoto, «Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain,» *Nature Structural Biology*, vol. 8, pp. 526-530, 2001.
- [303] D. Karathanassis, R. V. Stahelin, J. Bravo, O. Perisic, C. M. Pacold, W. Cho et R. L. Williams, «Binding of the PX domain of p47phox to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction,» *EMBO J.*, vol. 21, p. 5057–5068, 2002 .
- [304] C. Massenet, S. Chenavas, C. Cohen-Addad, M.-C. Dagher, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula et F. Fieschi, «Effects of p47phox C Terminus Phosphorylations on Binding Interactions with p40phox and p67phox,» *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 13752-13761, 2005.
- [305] K. Lapouge, S. J. M. Smith, P. A. Walker, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon et K. Rittinger, «Structure of the TPR Domain of p67phox in Complex with Rac-GTP,» *Mol. Cell*, vol. 6, pp. 899-907, 2000.
- [306] T. H. H. Oda, N. Kuwabara, S. Akashi, K. Hayashi, C. Kojima, H. Wong, T. Kawasaki, S. K., S. M. et S. T., «The structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications,» *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 1435-1445, 2010.
- [307] C. Hajjar, M. V. Cherrier, G. D. Mirandela, I. Petit-Hartlein, M. J. Stasia, J. C. Fontecilla-Camps, F. Fieschi et J. Dupuy, «The NOX Family of Proteins Is Also Present in Bacteria,» *mBio.*, vol. 8, pp. 1487-1517, 2017.
- [308] T. Von Rozycki, M. Yen, E. Lende et M. J. Saier, «The YedZ family: possible heme binding proteins that can be fused to transporters and electron carriers,» *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 8, pp. 129-140, 2004.
- [309] L. Sanchez-Pulido, A. M. Rojas, A. Valencia, C. Martinez et M. A. Andrade, «ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer,» *BMC Cancer.*, vol. 4, 2004.
- [310] X. Zhang, K.-H. Krause, I. Xenarios, T. Soldati et B. Boeckmann, «Evolution of the Ferric Reductase Domain (FRD) Superfamily: Modularity, Functional Diversification, and Signature Motifs,» *PLOS One*, vol. 8, p. e58126, 2013 .
- [311] C. Juillan-Binard, A. Picciocchi, J.-P. Andrieu, J. Dupuy, I. Petit-Hartlein, C. Caux-Thang, C. Vivès, V. Nivière et F. Fieschi, «A Two-component NADPH Oxidase (NOX)-like System in Bacteria Is Involved in the Electron Transfer Chain to the Methionine Sulfoxide Reductase MsrP,» *J. Biol. Chem.*, vol. 10, p. 2485–2494, 2017 .
- [312] T. Omata et N. Murata, «Electron-transport reactions in cytoplasmic and thylakoid membranes prepared from the cyanobacteria (blue-green algae) *Anacystis nidulans* and *Synechocystis*,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 810, pp. 354-361, 1985.
- [313] F. Magnani, S. Nenci, E. Millana Fananas, M. Ceccon, E. Romero, M. Fraaije et A. Mattevi, «Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 114, pp. 6764-6769, 2017.

[314] H. M. Jackson, T. Kawahara, Y. Nisimoto, S. M. E. Smith et J. D. Lambeth, «Nox4 B-loop Creates an Interface between the Transmembrane and Dehydrogenase Domains,» *J. Biol. Chem.* , vol. 14, p. 10281–10290, 2010.

[315] J. D. Lambeth, «Nox Enzymes and the Biology,» *Nature*, vol. 4, pp. 181-189, 2004.

Bibliographie Partie II - Techniques de caractérisation structurales et biochimiques de SpNox

- [1] N. Boodhun, «Seeing is believing: structures and functions of biological molecules,» *Biotechniques*, vol. 64, pp. 143-146, 2018.
- [2] A. C. Anderson, «The Process of Structure-Based Drug Design,» *Chemistry & Biology*, vol. 10, p. 787–797, 2003.
- [3] R. Nitta, T. Imasaki et E. Nitta, «Recent progress in structural biology: lessons from our research history,» *Microscopy*, p. 1–9, 2018.
- [4] P. Craveur et al, «Protein flexibility in the light of structural alphabets,» *Front. Mol. Biosci.*, vol. 2, pp. 1-20, 2015.
- [5] P. Aloy et R. B. Russell, «Interrogating Protein Interaction Networks Through Structural Biology,» *PNAS*, vol. 99, p. 5896–5901, 2002.
- [6] A. B. Ward, A. Sali et I. A. Wilson, «Integrative Structural Biology,» *Science*, vol. 22, p. 913–915, 2013 .
- [7] L. T. Lamech, A. L. Mallam et A. M. Lambowitz, «Evolution of RNA-Protein Interactions: Non-Specific Binding Led to RNA Splicing Activity of Fungal Mitochondrial Tyrosyl-tRNA Synthetases,» *PLOS Biology*, vol. 12 , p. e1002028, 2014.
- [8] P. Paukstelis, R. Coon, L. Madabusi, J. Nowakowski, A. Monzingo, J. Robertus et A. Lambowitz, «A tyrosyl-tRNA synthetase adapted to function in group I intron splicing by acquiring a new RNA binding surface,» *Molecular Cell*, vol. 17, p. 417–428, 2005.
- [9] C. J. Williams et al, «Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power,» *Protein Engineering*, vol. 12, p. 243–250, 1999.
- [10] V. Khanna, S. Ranganathan et N. Petrovsky, «Rational Structure-Based Drug Design,» chez *Life Science*, 2018, pp. 1-16.
- [11] P. E. Wright et H. J. Dyson, «NMR Structural Studies of Flexible Molecules,» chez *NMR as a Structural Tool for Macromolecules pp* , 1996, pp. 245-249.
- [12] E. Nogales, «The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique,» *Nat. Methods*, vol. 13, p. 24–27, 2016 .
- [13] A. Bartesaghi, A. Merk, S. Banerjee, D. Matthies, X. Wu, J. Milne et S. Subramaniam, «2.2 Å resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor,» *Science*, vol. 348, pp. 1147-1151, 2015.
- [14] R. I. Frankel, «Centennial of Röntgen's discovery of x-rays,» *West J Med.* , vol. 164, p. 497–501, 1996.

- [15] C. Kittel, Introduction to solid state physics. Fifth edition., United Kingdom, 1976.
- [16] M. Eckert, «Max von Laue and the discovery of X-ray diffraction in 1912,» *Ann. Phys.*, vol. 524, p. A83–A85, 2012.
- [17] C. J. Humphreys, «The significance of Bragg's law in electron diffraction and microscopy, and Bragg's second law,» *Acta Cryst.*, vol. A69, p. 45–50, 2013.
- [18] M. Jaskolski, Z. Dauter et A. Wlodawer, «A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits,» *FEBS J.*, vol. 281, p. 3985–4009, 2014 .
- [19] B. Strandberg, «Chapter 1: building the ground for the first two protein structures: myoglobin and haemoglobin,» *J Mol Biol.*, vol. 392, pp. 2-10, 2009 .
- [20] G. L. Taylor, «Introduction to phasing,» *Acta Cryst.*, vol. D66, p. 325–338, 2010.
- [21] G. M. Sheldrick, Z. Dauter, K. S. Wilson, H. Hope et L. C. Sieker, «The Application of Direct Methods and Patterson Interpretation to High-Resolution Native Protein Data,» *Acta Cryst.*, vol. D49, pp. 18-23, 1993.
- [22] M. C. Burla, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo et G. Polidori, «Solving proteins at non-atomic resolution by direct methods: Update,» *J. Appl. Cryst.*, vol. 50, p. 1048–1055, 2017.
- [23] A. Vagin et A. Teplyakov, «MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement,» *J. Appl. Cryst.*, vol. 30, pp. 1022-1025, 1997.
- [24] A. McCoy, «Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser,» *Acta Cryst.*, vol. D63, p. 32–41, 2007.
- [25] M. G. Rossmann, «Molecular replacement ± historical background,» *Acta Cryst.*, vol. D57, pp. 1360-1366, 2001.
- [26] R. Fourme, W. Shepard, M. Schiltz, T. Prangé, M. Ramin, R. Kahn, E. d. I. Fortelle et G. Bricogne, «Better structures from better data through better methods: a review of developments in de novo macromolecular phasing techniques and associated instrumentation at LURE,» *J. Synchrotron Rad.*, vol. 6, pp. 834-844, 1999.
- [27] J. Karle, «Some developments in anomalous dispersion for the structural investigation of macromolecular systems in biology,» *International Journal of Quantum Chemistry: Quantum Biology Symposium*, vol. 7, pp. 357-367 , 1980.
- [28] W. Hendrickson, J. Smith et S. Sheriff, «Direct phase determination based on anomalous scattering,» *Meth. Enzymol.*, vol. 115, p. 41–55, 1985.
- [29] S. Doublié, «Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination,» *Methods Enzymol. ;*, vol. 276, pp. 523-30, 1997.
- [30] T. Weinert et al, «Fast native-SAD phasing for routine macromolecular structure determination,» *Nat. Methods.*, vol. 12, pp. 131-3, 2015 .
- [31] F. Hunefeld, Der Chemismus in der thierischen Organisation, Leipzig: Brockhaus, 1840.

- [32] T. Hartig, «Über das Klebermehl,» *Botanische Zeitung*, vol. 13, pp. 881-882, 1855.
- [33] T. Osborne, «Crystallized vegetable proteids,» *Amer. Chem.*, vol. 14, p. 662-689, 1892.
- [34] J. Northrop, «Crystalline pepsin: II. General properties and experimental methods,» *J. Gen. Physio.*, p. 767-780, 1930.
- [35] J. Sumner et A. Dounce, «Crystalline catalase,» *Science*, vol. 85, p. 366-367, 1937.
- [36] W. Stanley, «Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus,» *Science*, vol. 81, p. 644-645, 1935.
- [37] R. Giegé, «A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day,» *FEBS Journal*, vol. 280, p. 6456-6497, 2013.
- [38] O. Funke, «Über das Milzvenenblut,» *Z. Rat. Med.*, vol. 1, p. 172-218, 1851.
- [39] F. Hofmeister, «Zur Lehre von der Wirkung der Salze,» *Arch. Exp. Path. Pharm.*, vol. 24, p. 247-260, 1888.
- [40] M. Ries-Kautt et A. Ducruix, «Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme,» *J. Biol. Chem.*, vol. 264, p. 745-748, 1989.
- [41] K. Collins, «Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process,» *Methods*, vol. 34, p. 300-311, 2004.
- [42] J. Bernal et D. Crowfoot, «X-ray photographs of crystalline pepsin,» *Nature*, vol. 133, p. 794-795, 1934.
- [43] S. Engilberge, «Nouveaux développements en biologie structurale basés sur des complexes de lanthanide,» 2017.
- [44] E. E. G. Saridakis, P. D. S. Stewart, L. F. Lloyd et D. M. Blow, «Phase diagram and dilution experiments in the crystallization of carboxypeptidase G2,» *Acta Cryst.*, vol. D50, pp. 293-297, 1994.
- [45] J. M. Garcia-Ruiz, «Nucleation of protein crystals,» *Journal of Structural Biology*, vol. 142, p. 22-31, 2003.
- [46] S. Khurshid, E. Saridakis, L. Govada et N. E. Chayen, «Porous nucleating agents for protein crystallization,» *Nature Protocols*, vol. 9, pp. 1621-1633, 2014.
- [47] P. Hartman et W. G. Perdok, «On the relations between structure and morphology of crystals. I,» *Acta Cryst.*, vol. 8, pp. 49-52, 1955.
- [48] J. D. Schmit et K. Dill, «Growth Rates of Protein Crystals,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, p. 3934-3937, 2012.
- [49] H. Research, «Crystal Growth 101,» 2019. [En ligne]. Available: https://hamptonresearch.com/uploads/cg_pdf/CG101_COMPLETE_2019.pdf.

- [50] E. M. Landau et J. P. Rosenbusch, «Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A Dec ; (25):* , vol. 93, p. 14532–14535, 1996 .
- [51] V. Cherezov, J. Liu, M. Griffith, M. A. Hanson et R. C. Stevens, «LCP-FRAP Assay for Pre-Screening Membrane Proteins for in Meso Crystallization,» *Cryst. Growth Des.*, vol. 8, p. 4307–4315, 2008.
- [52] J. Jancarik et a. S. Kim, «Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins,» *J. Appl. Cryst.*, vol. 24, pp. 409-411, 1991.
- [53] N. Chayen et E. Saridakis, «Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal,» *Nat. Methods.*, vol. 5, pp. 147-53, 2008 .
- [54] S. Krzywda et S. Wosicki, «1. Protein handling and crystallization, including robotic crystallization,» 2018. [En ligne]. Available: <http://biocryst-stud.home.amu.edu.pl/SERP/ex1.html>.
- [55] A. McPherson, Preparation and analysis of protein crystals, Krieger Publishing, 1982.
- [56] T. Bergfors, Protein crystallization ; techniques, strategies, and tips : a laboratory manual, International University Line, 1999.
- [57] T. Bergfors, «Seeds to crystals,» *Journal of Structural Biology*, vol. 142, p. 66–76, 2003.
- [58] D. R. Cooper et al, «Protein crystallization by surface entropy reduction: optimization of the SER strategy,» *Acta Cryst.*, vol. D63, p. 636–645, 2007.
- [59] L. Goldschmidt, D. Eisenberg, Z. S. Derewenda et D. R. Cooper, «Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants,» *Protein Science*, vol. 16, pp. 1569-76, 2007.
- [60] N. Junius et al, «A crystallization apparatus for temperature-controlled flow-cell dialysis with real-time visualization,» *J. Appl. Cryst.*, vol. 49, pp. 806-813, 2016.
- [61] A. McPherson et J. A. Gavira, «Introduction to protein crystallization,» *Acta Cryst.*, vol. F70, p. 2–20, 2014.
- [62] A. Seddon, P. Curnow et P. Booth, «Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera,» *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1666, pp. 105-17, 2004.
- [63] D. L. Parton, J. W. Klingelhoefer et Mark S.P. Sanson, «Aggregation of Model Membrane Proteins, Modulated by Hydrophobic Mismatch, Membrane Curvature, and Protein Class,» *Biophys J.*, vol. 101, p. 691–699, 2011 .
- [64] M. C. Wiener, «A pedestrian guide to membrane protein crystallization,» *Methods*, vol. 34, pp. 364-372, 2004.
- [65] P. J. Loll, «Membrane proteins, detergents and crystals: what is the state of the art?,» *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.*, vol. 70, p. 1576–1583, 2014.

- [66] W. Kabsch, «Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants,» *J. Appl. Cryst.*, Vols. %1 sur %2, , pp. 795-800, 1993.
- [67] M. D. Winn et al., «Overview of the CCP4 suite and current developments,» *Acta Cryst.*, vol. D67, pp. 235-242, 2011.
- [68] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott et K. Cowtand, «Features and development of Coot,» *Acta Cryst.*, vol. D66, p. 486–501, 2010.
- [69] A. T. Brünger, «Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures,» *Nature volume*, vol. 355, p. 472–475, 1992.
- [70] G. Kleywegt, J. et A. Brünger, «Checking your imagination: applications of the free R value,» *Structure*, vol. 4, pp. 897-904, 1996 .
- [71] I. J. Tickle, R. A. Laskowski et D. S. Moss, «Rfree and the Rfree ratio. Part I: derivation of expected values of cross-validation residuals used in macromolecular least-squares refinement,» *Acta Cryst., Vol.*, vol. D54, pp. 547-557, 1998.
- [72] R. A. Engh et R. Huber, «Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement,» *Acta Cryst.*, vol. A47, pp. 392-400, 1991.
- [73] C. Ramakrishnan et G. N. Ramachandran, «Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units,» *Biophys J. Nov*, vol. 5, p. 909–933, 1965 .
- [74] M. Guttman, P. Weinkam, A. Sali et K. K. Lee, «All-atom ensemble modeling to analyze small angle X-ray scattering of glycosylated proteins,» *Structure. Mar*, vol. 3, p. 1016, 2013.
- [75] E. Mahieu et F. Gabel, «Biological small-angle neutron scattering: recent results and development,» *Acta Cryst.*, vol. D74, pp. 715-726, 2018.
- [76] G. A. Bentley et S. A. Mason, «Neutron Diffraction Studies of Proteins,» *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 290, pp. 505-510, 1980.
- [77] D. I. Svergun et M. H. J. Koch, «Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution,» *Rep. Prog. Phys.*, vol. 66 , p. 1735–1782, 2003.
- [78] J. L. Cole, J. W. Lary, T. P. Moody et T. M. Laue, «Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium,» *METHODS IN CELL BIOLOGY*, vol. 84, pp. 143-177, 2008.
- [79] P. H. Brown, A. Balbo et P. Schuck, «Characterizing Protein-Protein Interactions by Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation,» *Current Protocols in Immunology*, vol. 18, pp. 5.1-18.15, 2008.
- [80] K. Katoh, J. Rozewicki, K. Yamada et ., «MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization,» *Brief. Bioinform.* , vol. 20, p. 1160–1166, 2019.
- [81] J. Pei, B.-H. Kim et N. V. Grishin, «PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments,» *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, p. 2295–2300, 2008 .

- [82] M. Clamp, J. Cuff, S. Searle et G. Barton, «The Jalview Java alignment editor,» *Bioinformatics*, vol. 20, pp. 426-427, 2004.
- [83] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson et Y. Zhang, «The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction,» *Nature Methods*, vol. 12, pp. 7-8, 2015.
- [84] E. Pettersen, T. Goddard, C. Huang, G. Couch, D. Greenblatt, E. Meng et T. Ferrin, «UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis,» *J. Comput. Chem.*, vol. 25, 2004.
- [85] P. W. Hildebrand et al, «SuperLooper—a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins,» *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, p. W571–W574, 2009 .
- [86] F. Magnani, S. Nenci, E. Millana Fananas, M. Ceccon, E. Romero, M. Fraaije et A. Mattevi, «Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 114, pp. 6764-6769, 2017.
- [87] E. HTX Lab, «Crystallization,» 2007. [En ligne]. Available: <https://htxlab.embl.fr/#/bridge/information/Crystallization>.
- [88] J. M. Garcia-Ruiz, L. A. Gonzalez-Ramirez, J. A. Gavira et F. Otálora, «Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques,» *Acta Cryst.*, vol. D58, pp. 1638-1642, 2002.
- [89] E. H. Lab, «Crystallization EMBL HTX Lab,» 2007. [En ligne]. Available: <https://htxlab.embl.fr/#/bridge/information/Crystallization>.

Bibliographie Partie III – Caractérisation structurale de SpNox entière

- [1] A. Rath, M. Glibowicka, V. Nadeau, G. Chen et C. Deber, «Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 106, pp. 1760-5, 2009 .
- [2] A. Ishchenko, E. E. Abola et V. Cherezov, «Crystallization of Membrane Proteins: An Overview,» *Protein Crystallography*, vol. 1607, pp. 117-141, 2017.
- [3] U. Omasits, C. Ahrens, S. Müller et B. Wollscheid, «Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data,» *Bioinformatics*, vol. 30, pp. 884-886, 2014.
- [4] V. M. d. Oliveira, V. d. G. Contessoto, F. B. d. Silva, D. L. Z. Caetano, S. J. d. Carvalho et V. B. P. Leite, «Effects of pH and Salt Concentration on Stability of a Protein G Variant Using Coarse-Grained Models,» *Biophysical Journal*, vol. 114, p. 65–75, 2018 .
- [5] X. Tadeo, B. Lopez-Mendez, D. Castan, T. Trigueros et O. Millet, «Protein Stabilization and the Hofmeister Effect: The Role of Hydrophobic Solvation,» *Biophysical Journal*, vol. 97 , p. 2595–2603, 2009.
- [6] K. Talley et E. Alexov, «On the pH-optimum of activity and stability of proteins,» *Proteins. September ; (12);*, vol. 78, p. 2699–2706., 2010 .
- [7] T. I. Lam, A. M. Brennan-Minnella, S. J. Won, Y. Shen, C. Hefner, Y. Shic, D. Sunc et R. A. Swanson, «Intracellular pH reduction prevents excitotoxic and ischemic neuronal death by inhibiting NADPH oxidase,» *PNAS*, vol. 110 , pp. E4362-E4368, 2013 .
- [8] A. M. Hassell, G. An, R. K. Bledsoe, J. M. Bynum, H. L. C. III, S.-J. J. Deng, R. T. Gampe, T. E. Grisard, K. P. Madauss, R. T. Nolte, W. J. Rocque, L. Wang, K. L. Weaver, S. P. Williams et G. Bruce, «Crystallization of protein–ligand complexes,» *Acta Cryst.*, vol. D63, p. 72–79, 2007.
- [9] I. Muller, «Guidelines for the successful generation of protein–ligand complex crystals,» *Acta Cryst.*, vol. D73, p. 79–92, 2017.
- [10] J. Jancarik et S. Kim, «Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins,» *J. Appl. Cryst.*, vol. 24, pp. 409-411, 1991.
- [11] K. A. Majorek, M. L. Kuhn, M. Chruszcz, W. F. Anderson et W. Minor, «Double trouble - Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments,» *Protein Science*, vol. 23, pp. 1359-1368, 2014.
- [12] W. T. Booth, C. R. Schlachter, S. Pote, N. Ussin, N. J. Mank, V. Klapper, L. R. Offermann, C. Tang, B. K. Hurlburt et M. Chruszcz, «Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability,» *ACS Omega*, vol. 3, pp. 760-768, 2018.
- [13] J. N. Abelson et M. I. Simon, *Methods in Enzymology*, Colowick & Kaplan, 2012.

- [14] K. M. Kim, E. C. Yi, D. Baker et K. Y. J. Zhang, «Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase,» *Acta Cryst.*, vol. D57, pp. 759-762, 2001.
- [15] M. Carson, D. H. Johnson, H. McDonald, C. Brouillette et L. J. DeLucas, «His-tag impact on structure,» *Acta Cryst.*, vol. D63, p. 295–301, 2007.
- [16] S. H. J. Smits, A. Mueller, M. K. Grieshaber et L. Schmitta, «Coenzyme and His-tag-induced crystallization of octopine dehydrogenase,» *Acta Cryst.*, vol. F64, p. 836–839, 2008.
- [17] B. Heras et J. Martin, «Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals,» *Acta Cryst.*, vol. D61, pp. 1173-1180, 2005.
- [18] M. J. Anderson, C. Lars, G. Hansen et S. R. Quake, «Phase knowledge enables rational screens for protein crystallization,» *PNAS*, vol. 103 , p. 16746–16751, 2006 .
- [19] B. W. Matthews, «Solvent content of protein crystals,» *J. Mol. Biol.*, vol. 33, p. 491–497, 1968.
- [20] C. X. Weichenberger et B. Rupp, «Ten years of probabilistic estimates of biocrystal solvent content: new insights via nonparametric kernel density estimate,» *Acta Cryst.*, vol. D70, p. 1579–1588, 2014.
- [21] A. McPherson et C. B., «Searching for silver bullets: an alternative strategy for crystallizing macromolecules,» *J. Struct. Biol.*, vol. 156, pp. 387-406, 2006 .
- [22] S. B. Larso, J. S. Day, C. Nguyen, R. Cudney et A. McPherson, «Progress in the Development of an Alternative Approach to Macromolecular Crystallization,» *Cryst. Growth Des.*, vol. 8, pp. 3038-3052, 2008.
- [23] T. Bergfors, «Seeds to crystals,» *Journal of Structural Biology*, vol. 142 , p. 66–76, 2003.
- [24] L. Yu, L. Xu, M. Xu, B. Wan, L. Yu et Q. Huang, «Role of Mg²⁺ ions in protein kinase phosphorylation: insights from molecular dynamics simulations of ATP-kinase complexes,» *Molecular Simulation*, vol. 37, pp. 1143-1150, 2011.
- [25] Z. Deng, A. Aliverti, G. Zanetti, A. K. Arakaki, J. Ottado, E. G. Orellan, N. B. Calcaterra, E. A. Ceccarelli, N. Carrillo et P. A. Karplus, «Nature Letter,» *A productive NADP⁺ binding mode of ferredoxin–NADP⁺ reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies*, vol. 6, p. 847–853, 1999.

Bibliographie Partie IV – Caractérisation structurale des domaines indépendants de SpNox

- [1] H. J. Sharpe, T. J. Stevens et S. Munro, «A Comprehensive Comparison of Transmembrane Domains Reveals Organelle-Specific Properties,» *Cell*, vol. 142, p. 158–169, 2010 .
- [2] M. Clamp, J. Cuff, S. Searle et G. Barton, «The Jalview Java alignment editor,» *Bioinformatics*, vol. 20, pp. 426-427, 2004.
- [3] J. Pei, B.-H. Kim et N. V. Grishin, «PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments,» *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, p. 2295–2300, 2008 .
- [4] Y. Zhang, «I-TASSER server for protein 3D structure prediction,» *BMC Bioinformatics*, vol. 9, 2008.
- [5] F. Magnani, S. Nenci, E. Millana Fananas, M. Ceccon, E. Romero, M. Fraaije et A. Mattevi, «Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 114, pp. 6764-6769, 2017.
- [6] L. Carrichon, A. Picciocchi, F. Debeurme, F. Defendi, S. Beaumel, A. Jesaitis, M. Dagher et M. Stasia, «Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes-Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events,» *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1808, pp. 78-90, 2011.
- [7] X. J. Li, D. Grunwald, J. Mathieu, F. Morel et M.-J. Stasia, «Crucial Role of Two Potential Cytosolic Regions of Nox2, 191TSSTKTIRRS200 and 484DESQANHFAVHHDEEKD500, on NADPH Oxidase Activation,» *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 14962-14973, 2005.
- [8] P. W. Hildebrand et al, «SuperLooper—a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins,» *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, p. W571–W574, 2009 .
- [9] Y. Zhang, «Protein structure prediction: when is it useful?,» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 19, p. 145–155, 2009.
- [10] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. P. III et N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Elsevier Academic Press, 1995.
- [11] B. Brutscher, P. Schanda et V. Forge, «Het-sofast nmr for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains.,» *Magn. Reson. Chem.*, vol. 44 , p. 177–84, 2006.
- [12] C. Malgrange, C. Ricolleau et F. Lefaucheux, *Symmetry and Physical Properties of Crystals*, EDP Sciences, 2011.
- [13] A. McCoy, R. Grosse-Kunstleve, P. Adams, M. Winn, L. Storoni et R. Read, «Phaser crystallographic software,» *J. Appl. Cryst.*, vol. 40, pp. 658-674, 2007.

- [14] D. Liebschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkóczi et al, «Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix,» *Acta Cryst.*, vol. D75, pp. 861-877, 2019.
- [15] J.-B. Claude, K. Suhre, C. Notredame, J.-M. Claverie et C. Abergel, «CaspR: a web server for automated molecular replacement using homology modelling,» *Nucleic Acids Research*, vol. 32, p. W606–W609, 2004.
- [16] S. K. Burley, H. M. Berman et al, «RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy,» *Nucleic Acids Research*, vol. 47, p. D464–D474, 2019.
- [17] J. A. Hermoso, T. Mayoral, M. Faro, C. Gómez-Moreno, S.-A. J. et M. Medina, «Mechanism of Coenzyme Recognition and Binding Revealed by Crystal Structure Analysis of Ferredoxin–NADP1 Reductase Complexed with NADP+,» *J. Mol. Biol.*, vol. 319, p. 1133–1142, 2002.
- [18] A. Ilari, A. Bonamore, A. Farina, K. A. Johnson et A. Boffi, «The X-ray Structure of Ferric Escherichia coli Flavohemoglobin Reveals an Unexpected Geometry of the Distal Heme Pocket,» *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 23725-23732, 2002.
- [19] C. M. Bruns et A. P. Karplus, «Refined Crystal Structure of Spinach Ferredoxin Reductase at 1.7 Å Resolution: Oxidized, Reduced and 2'-Phospho-5'-AMP Bound States,» *J. Mol. Biol.*, vol. 247, pp. 125-145, 1995.
- [20] S. Kim, M. Suga, K. Ogasahara, T. Ikegami, Y. Minami, T. Yubisui et T. Tsukihara, «Structure of Physarum polycephalum cytochrome b5 reductase at 1.56 Å resolution,» *Acta Cryst.*, vol. F63, pp. 274-279, 2007.
- [21] C. Juillan-Binard, A. Picciocchi, J.-P. Andrieu, J. Dupuy, I. Petit-Hartlein, C. Caux-Thang, C. Vivès, V. Nivière et F. Fieschi, «A Two-component NADPH Oxidase (NOX)-like System in Bacteria Is Involved in the Electron Transfer Chain to the Methionine Sulfoxide Reductase MsrP,» *J. Biol. Chem.*, vol. 10, p. 2485–2494, 2017 .
- [22] M. Ingelman, S. Ramaswamy, V. Nivière, M. Fontecave et H. Eklund, «Crystal Structure of NAD(P)H:Flavin Oxidoreductase from Escherichia coli,» *Biochemistry*, vol. 38, pp. 7040-7049, 1999.
- [23] A. Bortolotti, I. Pérez-Dorado, G. Goñi, M. Medina, J. A. Hermoso, N. Carrillo et N. Cortez, «Coenzyme binding and hydride transfer in Rhodobacter capsulatus ferredoxin/ flavodoxin NADP(H) oxidoreductase,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1794 , p. 199–210, 2009.
- [24] J. Steuber, G. Vohl, M. S. Casutt, T. Vorburger, K. Diederichs et G. Fritz, «Structure of the V. cholerae Na⁺-pumping NADH:quinone oxidoreductase,» *Nature*, vol. 516, p. 62–67, 2014.
- [25] E. D. Garcin et al, «Structural Basis for Isozyme-specific Regulation of Electron Transfer in Nitric-oxide Synthase,» *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 37918-37927, 2004.
- [26] G. Niu, S. Zhao, L. Wang, W. Dong, L. Liu et Y. He, «Structure of the Arabidopsis thaliana NADPH-cytochrome P450 reductase 2 (ATR2) provides insight into its function,» *FEBS*, vol. 284, pp. 754-765, 2017.

- [27] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson et Y. Zhang, «The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction,» *Nature Methods*, vol. 12, pp. 7-8, 2015.
- [28] K. Cowtan, «The Buccaneer software for automated model building,» *Acta Crystallographica Section D*, vol. 62, pp. 1002-1011, 2006.
- [29] G. L. Taylor, «Introduction to phasing,» *Acta Cryst.*, vol. D66, p. 325–338, 2010.
- [30] T. Weinert et al, «Fast native-SAD phasing for routine macromolecular structure determination,» *Nat. Methods.*, vol. 12, pp. 131-3, 2015 .
- [31] T. Beck, T. Gruene et G. M. Sheldrick, «The magic triangle goes MAD: experimental phasing with a bromine derivative,» *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, p. 374–380, 2010 .
- [32] M. Dauter et Z. Dauter, «Phase determination using halide ions,» *Methods Mol Biol.*, vol. 364, pp. 149-158, 2007.
- [33] A. Pike et al., «An overview of heavy-atom derivatization of protein crystals,» *Acta Crystallogr D Struct Biol.*, vol. 72, p. 303–318, 2016.
- [34] M. D. Winn et al., «Overview of the CCP4 suite and current developments,» *Acta Cryst.*, vol. D67, pp. 235-242, 2011.
- [35] G. J. Kleywegt et T. A. Jones, «Model Building and Refinement Practice,» *Methods in Enzymology*, vol. 277, pp. 208-230, 1997.
- [36] A. Picciocchi, F. Debeurme, S. Beaumel, M.-C. Dagher, D. Grunwald, A. J. J. et M.-J. Stasia, «Role of Putative Second Transmembrane Region of Nox2 Protein in the Structural Stability and Electron Transfer of the Phagocytic NADPH Oxidase,» *J. Biol. Chem.*, vol. 286, p. 28357–28369, 2011.

Bibliographie Partie V – Etude structure fonction

- [1] P. A. Hubbard, A. L. Shen, R. Paschke, C. B. Kasper et J.-J. P. Kim, «NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase,» *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 29163–29170, 2001 .
- [2] Z. Deng, A. Aliverti, G. Zanetti, A. K. Arakaki, J. Ottado, E. G. Orellan, N. B. Calcaterra, E. A. Ceccarelli, N. Carrillo et P. A. Karplus, «Nature Letter,» *A productive NADP+ binding mode of ferredoxin–NADP+ reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies*, vol. 6, p. 847–853, 1999.
- [3] M. Brylinski, «Aromatic interactions at the ligand-protein interface: Implications for the development of docking scoring functions,» *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 91, pp. 380-390, 2018.
- [4] A. Gutierrez, M. Paine, C. R. Wolf, N. S. Scrutton et G. C. K. Roberts, «Relaxation Kinetics of Cytochrome P450 Reductase: Internal Electron Transfer Is Limited by Conformational Change and Regulated by Coenzyme Binding,» *Biochemistry* , vol. 41, pp. 4626-4637, 2002.
- [5] M. G. Rossmann, D. Moras et K. W. Olsen, «Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein,» *Nature*, vol. 250, p. 194–199, 1974.
- [6] H. Sumimoto, «Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species,» *FEBS Journal*, vol. 275 , p. 3249–3277, 2008.
- [7] X. J. Li, F. Fieschi, M. H. Paclet, D. Grunwald, Y. Campion, P. Gaudin, F. Morel et M.-J. Stasia, «Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly,» *Journal of Leukocyte Biology* , vol. 81, pp. 1-12, 2007.
- [8] F. Magnani, S. Nenci, E. Millana Fananas, M. Ceccon, E. Romero, M. Fraaije et A. Mattevi, «Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 114, pp. 6764-6769, 2017.
- [9] U. Omasits, C. Ahrens, S. Müller et B. Wollscheid, «Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data,» *Bioinformatics*, vol. 30, pp. 884-886, 2014.
- [10] M. V. C. Nguyen, B. Lardy, M.-H. P. F. Rousset, S. Berthier, A. Baillet, L. Grange, P. Gaudin et F. Morel, «Nox: new isoenzymes family,» *Med. Sci.*, vol. 31 , p. 43–52, 2015 .

Bibliographie Partie VI – Ouverture et Conclusion générale

- [1] S. Sheriff et W. A. Hendrickson, «Description of overall anisotropy in diffraction from macromolecular crystals,» *Acta Cryst.*, vol. A43, pp. 118-121, 1987.
- [2] V. Chaptal, A. Kilburg, D. Flot, B. Wiseman, N. Aghajari, J.-M. Jault et P. Falson, «Diffraction anisotropy falloff in the direction of the detergent belt for two centered monoclinic crystals of OmpF,» *Data in Brief*, vol. 7, pp. 726-729, 2016.
- [3] M. Strong, M. R. Sawaya, S. Wang, M. Phillips, D. Cascio et D. Eisenberg, «Toward the structural genomics of complexes: Crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*,» *PNAS*, vol. 103, pp. 8060-8065, 2006.
- [4] M. Zhang, A. F. Monzingo, L. Segatori, G. Georgiou et J. D. Robertus, «Structure of DsbC from *Haemophilus influenzae*,» *Acta Crystallographica Section D*, vol. 60, pp. 1512-1518, 2004.
- [5] X. Robert, J. Kassis-Sahyoun, N. Ceres, J. Martin, M. R. Sawaya, R. J. R. P. Guet, P. Falson et V. Chaptal, «X-ray diffraction reveals the intrinsic difference in the physical properties of membrane and soluble proteins,» *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 1-9, 2017.
- [6] I. Tickle et al., STARANISO, Global Phasing, 2016.
- [7] J. Birch, D. Axford, J. Foadi, A. Meyer, A. Eckhardt, Y. Thielmann et I. Moraes, «The fine art of integral membrane protein crystallisation,» *Methods*, vol. 147, pp. 150-162, 2018.

ANNEXES

- Fiches Plasmides
- Données supplémentaires de l'article
- Communications scientifiques

VIII

pET30b-His-SpNox

Caractéristiques de la construction			
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGS_RSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLLESWFHSLEKVYTV HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIFYFASIILVAYLGKYIQYEAWRWIHLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLTFNL LSFLVGSYALLGGLAGFYIIFLYQKISFPYLGKITHLKRLNHDTREIQIHLSRPFNYQSGQFAFLKIFQEGFESAPHPFSISGGHGQTL YFTVKTSGDHTKNIYDNLQAGSKVTLDRAYGHMIIIEEGRENQVWIAGGIGITPFISYIREHPILDKQVHFYYSFRGDENAVYLDLL RNYAQKNPNFELHLIDSTKDGYNFEQKEVPEHATVYMCGPISMMKALAKQIKKQNPKTELIYEGFKFK</p>			
417aa	MW=48081Da	$\epsilon_{280nm}=68760 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ Détermination par hydrolyse acide avec rationalisation groupement héminiques et FAD : $\epsilon_{416nm}=217790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm}=108083 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.39

pET30b-His-SpNoxTM

Caractéristiques de la construction			
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGS_RSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLLESWFHSLEKVYTV HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIFYFASIILVAYLGKYIQYEAWRWIHLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLTFNL LSFLVGSYALLGGLAGFYIIFLYQ</p>			
197aa	MW=22660 Da	$\epsilon_{280nm}=43890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.89

pET30b-His-SpNox^{DH}

Caractéristiques de la construction			
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGS_KISFPYLGKITHLKRLNHDTREIQIHLSRPFNYQSGQFAFLKIFQEGFESAPHPFSISGGHGQTLYFTVK TSGDHTKNIYDNLQAGSKVTLDRAYGHMIIIEEGRENQVWIAGGIGITPFISYIREHPILDKQVHFYYSFRGDENAVYLDLLRNYA QKNPNFELHLIDSTKDGYNFEQKEVPEHATVYMCGPISMMKALAKQIKKQNPKTELIYEGFKFK</p>			
237aa	MW=27136 Da	$\epsilon_{280nm}=24870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.10

pET30b-His-SpNox F397S

Caractéristiques de la construction			
			
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGS_{RSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLESWFHSLEKVYTV} HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIFYASIILVAYLGKIQYEAWRWIHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLLTFNL LSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYQKISFPYLGKITHLKRNLNHDREIQIHLSRPFNYQSGQFAFLKIFQEGFESAPHPFSISGGHGQTL YFTVKTSGDHTKNIYDNLQAGSKVTLDRAYGHMIIIEEGRENQVWIAGGIGITPFISYIREHPILDQKVHFYYSFRGDENAVYLDLL RNYAQKNPNFELHLIDSTKDGYNFEQKEVPEHATVYMCGPISMMKALAKQIKKQNPKTELIYEGSKFK</p>			
417aa	MW=48020.97 Da	$\epsilon_{280nm}=68760 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ Détermination par hydrolyse acide avec rationalisation groupement héminiques et FAD : $\epsilon_{416nm}=21790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm}=108083 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.39

pET30b-His-SpNox_{DH} F397S

Caractéristiques de la construction			
			
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGS_{KISFPYLGKITHLKRNLNHDREIQIHLSRPFNYQSGQFAFLKIFQEGFESAPHPFSISGGHGQTLYFTVK} TSGDHTKNIYDNLQAGSKVTLDRAYGHMIIIEEGRENQVWIAGGIGITPFISYIREHPILDQKVHFYYSFRGDENAVYLDLLRNYA QKNPNFELHLIDSTKDGYNFEQKEVPEHATVYMCGPISMMKALAKQIKKQNPKTELIYEGSKFK</p>			
237aa	MW=27207.96 Da	$\epsilon_{280nm}= 24870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.10

pET30b-His-SpNox F397W

Caractéristiques de la construction			
			
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGS_{RSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLESWFHSLEKVYTV} HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIFYASIILVAYLGKIQYEAWRWIHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLLTFNL LSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYQKISFPYLGKITHLKRNLNHDREIQIHLSRPFNYQSGQFAFLKIFQEGFESAPHPFSISGGHGQTL YFTVKTSGDHTKNIYDNLQAGSKVTLDRAYGHMIIIEEGRENQVWIAGGIGITPFISYIREHPILDQKVHFYYSFRGDENAVYLDLL RNYAQKNPNFELHLIDSTKDGYNFEQKEVPEHATVYMCGPISMMKALAKQIKKQNPKTELIYEGWKFk</p>			
417aa	MW=48120.10 Da	$\epsilon_{280nm}=74260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ Détermination par hydrolyse acide avec rationalisation groupement héminiques et FAD : $\epsilon_{416nm}=230857 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm}=112666 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.39

pET30b-His-SpNox_{DH} F397W

Caractéristiques de la construction			
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="background-color: yellow; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">7 His</div> <div style="background-color: green; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">Thr</div> <div style="background-color: #cccccc; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">SpNox_{DH} [K181-S400] F397W</div> </div>			
Séquence protéique annotée :			
HHHHHHH AGLVPRGS KISFPYLGKITHLKRNLNHDTRAIQIHLSPFNYSQSQFAFLKIFQEGFESAPHPFSISGGHGQTLYFTVK TSGDHTKNIYDNLQAGSKVTLDRAYGHMIIIEGRENQVWIAGGIGITPFISYIREHPILDKQVHFYYSFRGDENAVYLDLLRNYA QKNPNFELHLIDSTKDGYNLFEQKEVPEHATVVMCGPISMMKALAKQIKKQNPKTELIYEGWKFK			
237aa	MW= 27307.09 Da	ε _{280nm} = 30370 M ⁻¹ cm ⁻¹	pI=9.10

pET30b-His-SpNox_{TM} 178 | hNOX_{2DH} 286

Caractéristiques de la construction			
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="background-color: yellow; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">7 His</div> <div style="background-color: green; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">Thr</div> <div style="background-color: #cccccc; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">SpNox_{TM} [M1-L178]</div> <div style="background-color: blue; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">hNOX_{2DH} [V286-F570]</div> </div>			
Séquence protéique annotée :			
HHHHHHH AGLVPRGS RSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLESWFHSLEKVYTV HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIFYASIIIVAYLGGYIYQYEAWRWIHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLLTFNL LSFLVGSYALLGLLAGFYIIFL VRFWRSQQKVITKVVTHPFKTIELQMKKKGFKMEVGQYIFVKCPKVKLEWHPFTLSAPEED FFSIHIRIVGDWTEGLFNACGCDKQEFQDAWKLPKIAVDGPGFTASEDVFSYEVVMLVGAGIGVTPFASILKSVWYKYCNNAT NLKLLKIYFYWLCRDTHAFEFADLLQLLESQMQERNNAGFLSYNIYLTGWDESQANHFVHHDEEKDVTGLKQKTLYGRP NWDNEFKTIASQHPNTRIGVFLCGPEALAEATLSKQISISNSES GPRGVHVFIFNKENF*			
480aa	MW=55181.29Da	ε _{280nm,H2O(S-S)} = 105685 M ⁻¹ cm ⁻¹ ε _{280nm,H2O(SH)} = 105310 M ⁻¹ cm ⁻¹	pI=8.97

pET30b-His-SpNox_{TM} 180 | hNOX_{2DH} 288

Caractéristiques de la construction			
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="background-color: yellow; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">7 His</div> <div style="background-color: green; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">Thr</div> <div style="background-color: #cccccc; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">SpNox_{TM} [M1-L178]</div> <div style="background-color: blue; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">hNOX_{2DH} [F288-F570]</div> </div>			
Séquence protéique annotée :			
HHHHHHH AGLVPRGS RSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLESWFHSLEKVYTV HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIFYASIIIVAYLGGYIYQYEAWRWIHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLLTFNL LSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYQ FWRSQQKVITKVVTHPFKTIELQMKKKGFKMEVGQYIFVKCPKVKLEWHPFTLSAPEED FFSIHIRIVGDWTEGLFNACGCDKQEFQDAWKLPKIAVDGPGFTASEDVFSYEVVMLVGAGIGVTPFASILKSVWYKYCNNAT NLKLLKIYFYWLCRDTHAFEFADLLQLLESQMQERNNAGFLSYNIYLTGWDESQANHFVHHDEEKDVTGLKQKTLYGRP NWDNEFKTIASQHPNTRIGVFLCGPEALAEATLSKQISISNSES GPRGVHVFIFNKENF*			
480aa	MW=55217.28Da	ε _{280nm,H2O(S-S)} = 107175 M ⁻¹ cm ⁻¹ ε _{280nm,H2O(SH)} = 106800 M ⁻¹ cm ⁻¹	pI=8.88

pET30b-His-SpNox_{TM} 178 | hNOX_{4DH} 300

Caractéristiques de la construction			
L178 Y300			
7 His	Thr	SpNox _{TM} [M1-L178]	hNOX _{4DH} [Y300-S576]
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLESWFHSLEKVYTV HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGWGSRLAAQFGNLAIFYASIIIVAYLGKIQYEAWRWIHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLLTFNL LSFLVGSYALLGGLAGFYIIFLYRYSNKPVTIISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPVSVALENHPFTLTMCPTETKA TFGVHLKIVGDWTERFRDLLPPSSQDSEILPFIQSRNYPKLYIDGPFQSPFEESLNYEVSLCVAGGIGVTPFASILNTLLDDWKPY KLRRLYFIWVCRDIQSFRWFADLLCMLHNKFWQENRPDYVNIQLYLSQTDGIQKIIGEKYHALNSRFLIGRPRWKLLFDEIAKY NRGKTVGVFCCGPNSLSKTLHKLSNQNNNSYGTRFEYNKESFS*</p>			
474aa	MW=54794 .1Da	$\epsilon_{280nm, H2O(S-S)} = 96635 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm, H2O(SH)} = 96260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.43

pET30b-His-SpNox_{TM} 180 | hNOX_{4DH} 302

Caractéristiques de la construction			
Q180 Y302			
7 His	Thr	SpNox _{TM} [M1-Q180]	hNOX _{4DH} [Y302-S576]
Séquence protéique annotée :			
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRLPLESWFHSLEKVYTV HKFTAFLSIILLIFHNFSMGGWGSRLAAQFGNLAIFYASIIIVAYLGKIQYEAWRWIHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRLLTFNL LSFLVGSYALLGGLAGFYIIFLYQYIRSNKPVTIISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPVSVALENHPFTLTMCPTETKA TFGVHLKIVGDWTERFRDLLPPSSQDSEILPFIQSRNYPKLYIDGPFQSPFEESLNYEVSLCVAGGIGVTPFASILNTLLDDWKPY KLRRLYFIWVCRDIQSFRWFADLLCMLHNKFWQENRPDYVNIQLYLSQTDGIQKIIGEKYHALNSRFLIGRPRWKLLFDEIAKY NRGKTVGVFCCGPNSLSKTLHKLSNQNNNSYGTRFEYNKESFS*</p>			
474aa	MW=54766 Da	$\epsilon_{280nm, H2O(S-S)} = 96635 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm, H2O(SH)} = 96260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.39

pET30b-His-SpNox_{TM} [BLoopLong NOX2 SnL44V68Nx2R73F100
DLoop]₁₇₈ | hNOX2_{DH} 286

Caractéristiques de la construction			
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">L44 R73</div> <div style="text-align: center;">V68 F100</div> <div style="text-align: center;">V113 I189</div> <div style="text-align: center;">I128 T208</div> <div style="text-align: center;">L178 V286</div> </div>			
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX2
SpNox _{TM}	D-loop hNOX2	SpNox _{TM}	hNOX2 _{DH}
Séquence protéique annotée :			
<p> HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFMSKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSRNLLSFLRGSSACCSTRVRRQLDR NLTFHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASIILITSTKTIRRSYFEVFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNR LLTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLVRFWRSQQKVITKVVTHPFKTIELQMKKKGFKMEVGQYIFVKCPKVKLEWHPFTLT SAPEEDFFSIHIRIVGDWTEGLFNACGCDKQEFQDAWKLPKIAVDGPFGTASEDVFSYEVVMLVGAGIGVTPFASILKSVWYK YCNNATNLKLLKIIFYWLCRDTHAFEWFADLLQLLESQMQRNNAGFLSYNIYLTGWDESQANHFVHHDEEKDVITGLKQK TLYGRPNWDNEFKTIASQHPNTRIGVFLCGPEALAEATLSKQSISNSESGPRGVHFIFNKENF* </p>			
487aa	MW=55914Da	$\epsilon_{280nm(S-S)} = 91830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm,H2O(SH)} = 91330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.31

pET30b-His-SpNox_{TM} [BLoopLong NOX2 SnL44V68Nx2R73F100
DLoop]₁₈₀ | hNOX2_{DH} 288

Caractéristiques de la construction			
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">L44 R73</div> <div style="text-align: center;">V68 F100</div> <div style="text-align: center;">V113 I189</div> <div style="text-align: center;">I128 T208</div> <div style="text-align: center;">Q180 F288</div> </div>			
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX2
SpNox _{TM}	D-loop hNOX2	SpNox _{TM}	hNOX2 _{DH}
Séquence protéique annotée :			
<p> HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFMSKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSRNLLSFLRGSSACCSTRVRRQLDR NLTFHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASIILITSTKTIRRSYFEVFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNR LLTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYQFWRSQQKVITKVVTHPFKTIELQMKKKGFKMEVGQYIFVKCPKVKLEWHPFTLT SAPEEDFFSIHIRIVGDWTEGLFNACGCDKQEFQDAWKLPKIAVDGPFGTASEDVFSYEVVMLVGAGIGVTPFASILKSVWYK YCNNATNLKLLKIIFYWLCRDTHAFEWFADLLQLLESQMQRNNAGFLSYNIYLTGWDESQANHFVHHDEEKDVITGLKQK TLYGRPNWDNEFKTIASQHPNTRIGVFLCGPEALAEATLSKQSISNSESGPRGVHFIFNKENF* </p>			
487aa	MW=55949.99Da	$\epsilon_{280nm,H2O(S-S)} = 93320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm,H2O(SH)} = 92820 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	pI=9.25

pET30b-His-SpNox_{TM} [BLoopLong NOX4 SnL44V68Nx4R77F104
DLoop]₁₇₈ | hNOX_{4DH} 300

Caractéristiques de la construction							
	L44 R77	V68 F104	V113 M174	I128 T193	L178 Y300		
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX4	SpNox _{TM}	D-loop hNOX4	SpNox _{TM}	hNOX4 DH
Séquence protéique annotée :							
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSRTLAYLRGSQKVPSSRRTRRLDKS RTFHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASILLMITASTYAIRVSNYDIFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGN RLLTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYRIRSNKPVTTISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPVSVALENHPFTLTMC PTETKATFGVHLKIVGDWTERFRDLLPSSQDSEILPFIQSRNYPKLYIDGPFPGSPFEESLNYEVSLCVAGGIGVTPFASILNTLLD DWKPKYLRRLYFIWVCRDIQSFWRWFADLLCMLHNKFWQENRPDYVNIQLYLSQTDGIQKIIGEKYHALNSRLFGRPRWKLLE DEIAKYNRGKTVGVFCCGPNLSKTLHKLSNQNSYGRFEYNKESFS*</p>							
481aa	MW=55229.52Da		$\epsilon_{280nm, H2O(S-S)} = 85635 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm, H2O(SH)} = 85260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$		pI=9.73		

pET30b-His-SpNox_{TM} [BLoopLong NOX4 SnL44V68Nx4R77F104
DLoop]₁₈₀ | hNOX_{4DH} 302

Caractéristiques de la construction							
	L44 R77	V68 F104	V113 M174	I128 T193	Q180 Y302		
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX4	SpNox _{TM}	D-loop hNOX4	SpNox _{TM}	hNOX4 DH
Séquence protéique annotée :							
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSRTLAYLRGSQKVPSSRRTRRLDKS RTFHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASILLMITASTYAIRVSNYDIFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGN RLLTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYQYIRSNKPVTTISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPVSVALENHPFTLTMC CPTETKATFGVHLKIVGDWTERFRDLLPSSQDSEILPFIQSRNYPKLYIDGPFPGSPFEESLNYEVSLCVAGGIGVTPFASILNTLL DDWKPKYLRRLYFIWVCRDIQSFWRWFADLLCMLHNKFWQENRPDYVNIQLYLSQTDGIQKIIGEKYHALNSRLFGRPRWKLLE FDEIAKYNRGKTVGVFCCGPNLSKTLHKLSNQNSYGRFEYNKESFS*</p>							
481aa	MW=55220.83Da		$\epsilon_{280nm, H2O(S-S)} = 85635 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280nm, H2O(SH)} = 85260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$		pI=9.69		

pET30b-His-SpNox_{TM} [BLoopShort NOX2 SnL52S61Nx2G81Q93
DLoop]₁₇₈ | hNOX2_{DH 286}

Caractéristiques de la construction						
	L52 G81	S61 Q93	V113 I189	I128 T208	L178 V286	
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX2	SpNox _{TM}	D-loop hNOX2	SpNox _{TM} hNOX2 DH
Séquence protéique annotée :						
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRGSSACCSTRVRRQLEKV YTVHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASIIILITSSTKTIRRSYFEVFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRL LTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLVRFWRSQQKVITKVVTHPFKTIELQMKKKGFKMEVGQYIFVKCPKVKLEWHPFTLTS APEEDFFSIHIRIVGDWTEGLFNACGCDKQEFQDAWKLPKIAVDGPFGTASEDVFSYEVVMLVGAGIGVTPFASILKSVWYKY CNNATNLKLLKIYFYWLCRDTHAFEFWFADLLQLLESQMQERNNAGFLSYNIYLTGWDESQANHFVHHDEEKDVITGLKQK TLYGRPNWDNEFKTIASQHPNTRIGVFLCGPEALAEATLSKQSIENSESGPRGVHFIFNKENF*</p>						
487aa	MW=55802.94Da		\square 280nm, H2O(S-S) = 93320 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϵ 280nm, H2O(SH) = 82820 M ⁻¹ cm ⁻¹		pI=9.24	

pET30b-His-SpNox_{TM} [BLoopShort NOX2 SnL52S61Nx2G81Q93
DLoop]₁₈₀ | hNOX2_{DH 288}

Caractéristiques de la construction						
	L52 G81	S61 Q93	V113 I189	I128 T208	Q180 F288	
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX2	SpNox _{TM}	D-loop hNOX2	SpNox _{TM} hNOX2 DH
Séquence protéique annotée :						
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRGSSACCSTRVRRQLEKV YTVHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASIIILITSSTKTIRRSYFEVFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGNRL LTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYQFWRSQQKVITKVVTHPFKTIELQMKKKGFKMEVGQYIFVKCPKVKLEWHPFTLTS APEEDFFSIHIRIVGDWTEGLFNACGCDKQEFQDAWKLPKIAVDGPFGTASEDVFSYEVVMLVGAGIGVTPFASILKSVWYKY CNNATNLKLLKIYFYWLCRDTHAFEFWFADLLQLLESQMQERNNAGFLSYNIYLTGWDESQANHFVHHDEEKDVITGLKQK TLYGRPNWDNEFKTIASQHPNTRIGVFLCGPEALAEATLSKQSIENSESGPRGVHFIFNKENF*</p>						
487aa	MW=55838.92Da		\square 280nm, H2O(S-S) = 94810 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϵ 280nm, H2O(SH) = 94310 M ⁻¹ cm ⁻¹		pI=9.17	

pET30b-His-SpNox_{TM}[BLoopShort NOX4 SnL52S61Nx4G85L97
DLoop]₁₇₈ | hNOX_{4DH} 300

Caractéristiques de la construction							
	L52 G85	S61 L97	V113 M174	I128 T193	L178 Y300		
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX4	SpNox _{TM}	D-loop hNOX4	SpNox _{TM}	hNOX4 DH
Séquence protéique annotée :							
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRGSQKVPSRRTRRLLEKV YTVHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASIILMITASTYAIRVSNYDIFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGN RLLTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYRIRSNKPVTIISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPVSVALENHPFTLTM PTETKATFGVHLKIVGDWTERFRDLLPSSQDSEILPFIQSRNYPKLYIDGPFPGSPFEESLNYEVSLCVAGGIGVTPFASILNTLLD DWKPYKLRRLYFIWVCRDIQSFRWFADLLCMLHNKFWQENRPDYVNIQLYLSQTDGIQKIIGEKYHALNSRLFGRPRWKLLE FDEIAKYNRGKTVGVFCCGPNSLSKTLHKLSNQNSYGRFEYNKESFS*</p>							
481aa	MW=55462.83Da		\square 280nm, H2O(S-S) = 85635 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϵ 280nm, H2O(SH) = 85260 M ⁻¹ cm ⁻¹		pI=9.65		

pET30b-His-SpNox_{TM}[BLoopShort NOX4 SnL52S61Nx4G85L97
DLoop]₁₈₀ | hNOX_{4DH} 302

Caractéristiques de la construction							
	L52 G85	S61 L97	V113 M174	I128 T193	Q180 Y302		
7 His	Thr	SpNox _{TM}	B-loop hNOX4	SpNox _{TM}	D-loop hNOX4	SpNox _{TM}	hNOX4 DH
Séquence protéique annotée :							
<p>HHHHHHHAGLVPRGSRSMEFSMKSVKGLLFIASFILTLTWMNTSPQFMIPGLALTSLSLTFILATRGSQKVPSRRTRRLLEKV YTVHKFTAFLSIILLIFHNFSMGGLWGSRLAAQFGNLAIYIFASIILMITASTYAIRVSNYDIFWYTHRLVYLAYILGLFHIYMIMGN RLLTFNLLSFLVGSYALLGLLAGFYIIFLYQYIRSNKPVTIISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPVSVALENHPFTLTM CPTETKATFGVHLKIVGDWTERFRDLLPSSQDSEILPFIQSRNYPKLYIDGPFPGSPFEESLNYEVSLCVAGGIGVTPFASILNTLL DDWKPYPKRRLYFIWVCRDIQSFRWFADLLCMLHNKFWQENRPDYVNIQLYLSQTDGIQKIIGEKYHALNSRLFGRPRWKLLE FDEIAKYNRGKTVGVFCCGPNSLSKTLHKLSNQNSYGRFEYNKESFS*</p>							
481aa	MW=55434.77Da		\square 280nm, H2O(S-S) = 85635 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϵ 280nm, H2O(SH) = 85260 M ⁻¹ cm ⁻¹		pI=9.61		

Supplementary informations

to

Interdomain flexibility within NADPH oxidase revealed by SANS using LMNG stealth-carrier.

Annelise Vermot^{1,†}, Isabelle Petit-Härtlein^{1,†}, Cecile Breyton¹, Aline Le Roy¹, Michel Thépaut¹, Corinne Vivès¹, Martine Moulin², Michaël Härtlein², Sergei Grudinin³, Susan M. E. Smith⁴, Christine Ebel¹, Anne Martel^{2,*}, Franck Fieschi^{1,*}.

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institut de Biologie Structurale, 38000 Grenoble, France; ²Institut Laue Langevin, 38000 Grenoble France; ³ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Inria, Grenoble INP, LJK, 38000 Grenoble, France; ⁴Department of Molecular and Cellular Biology, Kennesaw State University, Kennesaw, GA, USA.

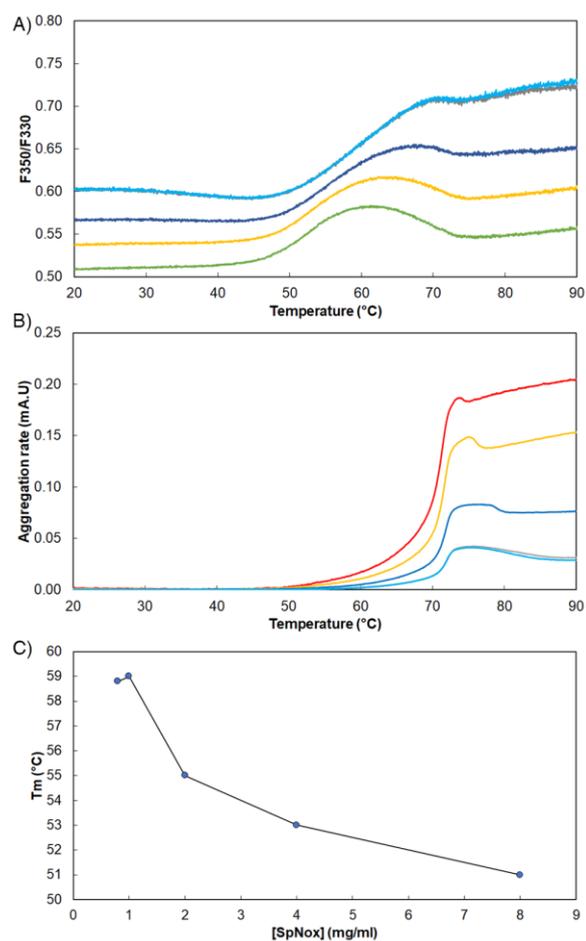


Figure S1: A) Evolution of thermal unfolding curves with SpNOX concentrations (0.8, 1, 2, 4 and 8 mg/ml) at pH7 in presence of 300 mM NaCl; B) Evolution of aggregation curves with SpNOX concentrations (0.8, 1, 2, 4 and 8 mg/ml) at pH7 in presence of 300mM NaCl. C) T_m dependency with SpNOX concentration from 0.8 to 8 mg/mL at pH7 in presence of 300mM NaCl.

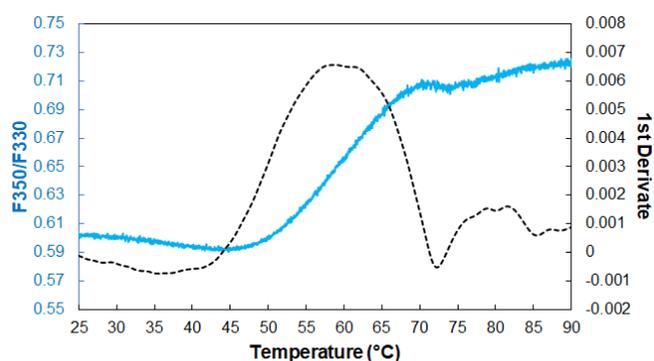


Figure S2: Results of SpNOX thermal stability obtained with the optimal concentration of SpNOX (1mg/mL) using NanoDSF. Thermal unfolding curve with SpNOX = 1mg/mL(blue curve). 1st derivative of the thermal unfolding curve with SpNOX = 1mg/mL

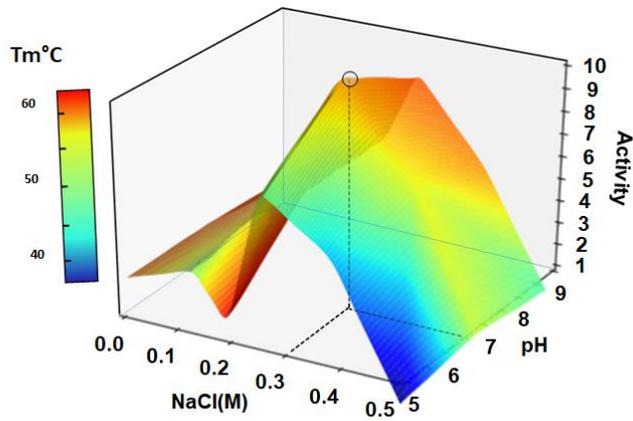


Figure S3: 3D representation of SpNOX specific activity and $T_m(^{\circ}\text{C})$ as function of pH and NaCl concentration. The z-axis represents the SpNOX specific activity while the color represents the $T_m(^{\circ}\text{C})$ value measured in same condition of pH and NaCl concentration. The dashed line represents the optimum condition (pH7, 300mM NaCl) to maximize both thermostability and activity.

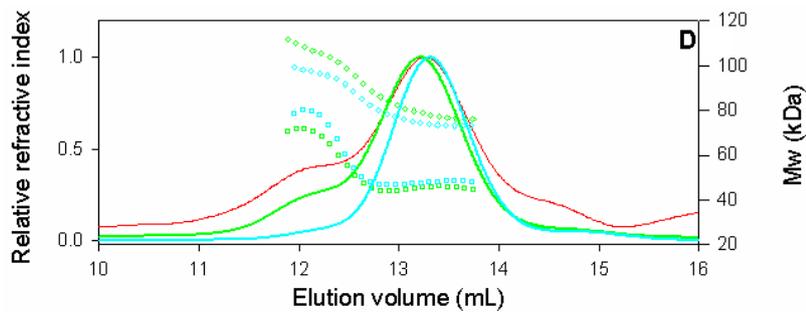


Figure S4: SEC-LS analysis of the SpNOX fractions from SEC-SANS experiment. Elution profiles (continuous lines), and analysis in term of SpNOX (square) and LMNG (diamond) molar masses for fractions 12 (red), 13 (green) and 14 (cyan), see figure 5.

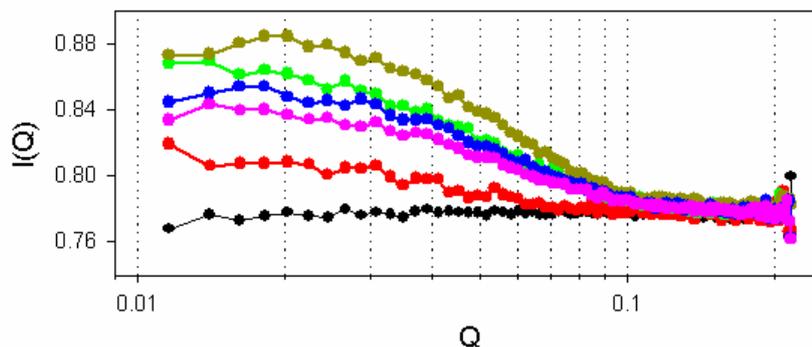


Figure S5: Averaged scattering curves of SpNOX from SEC-SANS experiment. The colors are those of the boxes defined in panel 7C, except the elution buffer (grey).

Table S1: Characterization of the fractions issued from SEC-SANS. TLC experiments were done as in Breyton, C., et al (2019). *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1861: 939–957.

	Absorbance		SEC-LS		monomer bound LMNG g/g	monomer wt%	MW SpNox shoulder kDa	dimer bound LMNG g/g	Specific activity mole cyt reduct/(s* mol de SpNox)	MALDI -TOF		Protein deuteration %	TLC LMNG mM total
	SpNOX mg/mL*	A416/A280	MW SpNOX monomer kDa	monomer bound LMNG g/g						MW main peak kDa	MW minor peak kDa		
F12	0.06	1.2	63	0.8	62	79	1.4			49.98	101.633	70	
F13	0.55	1.5	46	1.7	78	70	1.5	4.6		49.966	101.808	70	
F14	1.17	1.9	48	1.5	94	77	1.3	8		49.896	100.372	67	2.8
F15	0.11	1.8											

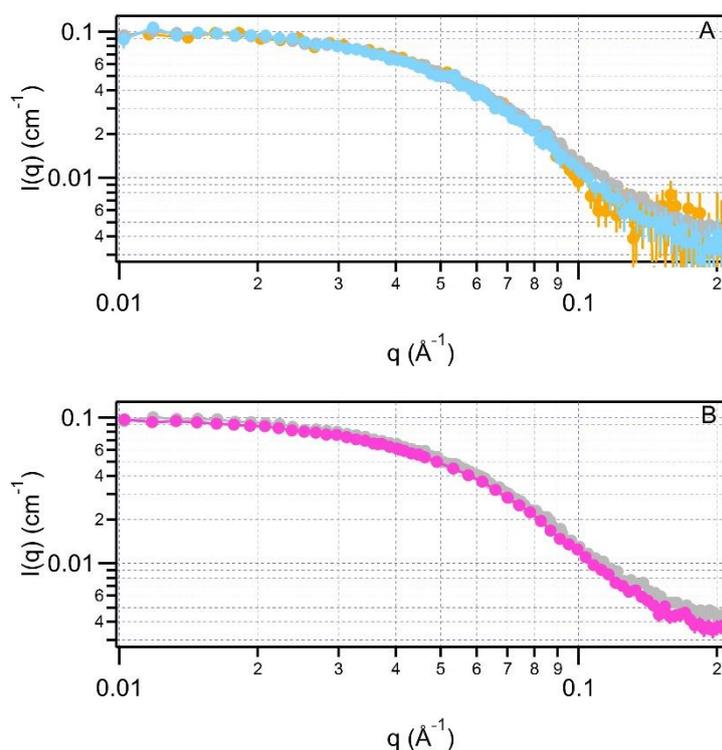


Figure S6: Scattering curves of SpNOX, in SEC-SANS and Static SANS, with and without His-Tag. (A) Superposition of the scattering curves of His-SpNOX, measured in SEC-SANS for boxes 3 to 5 (orange), and of an independent sample collected after size exclusion chromatography, before (blue) and after (grey) sevenfold concentration. (B) Superposition of the scattering curves of His-SpNOX (grey), and Tagfree-SpNOX (pink), from size exclusion chromatography followed by concentration. All scattering curves were normalized to the forward scattering intensity calculated for 1 mg mL⁻¹ monomer, and background adjustment to that of the SEC-SANS data. The solvent is 50 mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 10 μM FAD, 0.025 mM LMNG, 21.4 % D₂O.

Table S2: Structural parameters resulting from Primus analysis of SANS data

GUINIER analysis	His-SpNOX	Tagfree-SpNOX
I(0) (cm ⁻¹)	0.0994	0.096
R _g (Å)	29.6	30.0
q _{min} (Å ⁻¹)	0.0118	0.0118
qR _g range	0.30 – 1.28	0.31 – 1.30

p(r) analysis	His-SpNOX	Tagfree-SpNOX
I(0) (cm ⁻¹)	0.09563	0.09968
R _g (Å)	30.0	29.9
D _{max} (Å)	97	99
q range for fitting	0.0118 – 0.1958	0.0118 – 0.1968

Ab initio shape reconstruction parameters

	His-SpNOX	Tagfree-SpNOX
DAMMIF (Default param, 13 calculations)		
q range for fitting	0.0118 – 0.19768	0.0118 – 0.1958
Symmetry, anisotropy assumptions	<i>P</i> 1, none	<i>P</i> 1, none
NSD (std deviation)	0.565 (0.020)	0.616 (0.021)
χ^2 range	0.446 – 0.459	0.347 – 0.357

Communications scientifiques

Publications

Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins.

Biochim Biophys Acta Biomembr., May 1;1861(5), p. 939–957, 2019

C. Breyton, W. Javed, A. Vermot, C.A. Arnaud, C. Hajjar, J. Dupuy, I. Petit-Härtlein, A. Le Roy, A. Martel, M. Thépaut, C. Orelle, J.M. Jault, F. Fieschi, L. Porcar, C. Ebel

Interdomain flexibility within NADPH oxidase revealed by SANS using LMNG stealthcarrier.

Submitted, Jan. 2020

A. Vermot, I. Petit-Härtlein, C. Breyton, A. Le Roy, M. Thépaut, C. Vivès, M. Moulin, M. Härtlein, S. Grudinin, S.M.E. Smith, C. Ebel, A. Martel, F. Fieschi

Communications orales

Structural and Biochemical Studies of a prokaryotic NADPH oxidase

Axe Maladies infectieuse et médecine moléculaire - MOLMED, IBS, Grenoble, Avril 2017

Assessment of the thermostability of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using a new nanoDSF system for crystallization assays

Groupe de recherche GDR3696, 3^{ème} réunion plénière, Porquerolles, Mai 2017

Assessment of the thermostability of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using a new nanoDSF technique for crystallization assays

10^{ème} Club Oxydase, Esch-sur-Alzette, Luxembourg, Juin 2017

NOX enzymes : Toward the structure determination of a prokaryotic NADPH oxidase homolog

Axe Protéines Membranaires - MP, IBS, Grenoble, Décembre 2018

Functional and Structural studies of SpNox, a prokaryotic homolog of NADPH oxidase enzymes

Kennesaw State University, Etats-Unis, Février 2019

Caractérisation structurale et biochimique de SpNox

Groupe de recherche GDR3696, 4^{ème} réunion plénière, Carqueiranne, Mai 2019

NanoDSF technology for thermostability enhancement of a prokaryotic NADPH oxidase homolog for crystallization assays

Symposium NanoTemper Technologies, Grenoble (IBS), Avril 2019

Thermostability optimization of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using nanoDSF technology for structural studies

85th Harden conference, Dynamic Membrane Complexes: Respiration and Transport Feedback Survey, Biochemical Society, Bonn, Allemagne, Août 2019

Posters

Assessment of the thermostability of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using a new nanoDSF technique for crystallization assays

10^{ème} Club Oxydase, Esch-sur-Alzette, Luxembourg, Juin 2017

A. Vermot, I. Petit-Härtlein, F. Dupeux, M. Thépaut, C. Vivès, S.M.E Smith, J. Dupuy, F. Fieschi

Assessment of the thermostability of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using a new nanoDSF technique for structural assays

Gordon Research Conference – GRC, Les Diablerets, Suisse, Mai-Juin 2018

A. Vermot, I. Petit-Härtlein, M. Thépaut, A. Martel, C. Vivès, C. Breyton, S.M.E. Smith, F. Fieschi

Assessment of the thermostability of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using a new nanoDSF technique for crystallization assays

Journée IBS, Grenoble, Juin 2018

A. Vermot, I. Petit-Härtlein, M. Thépaut, F. Dupeux, C. Vivès, J. Dupuy, S.M.E Smith, F. Fieschi

Assessment of the thermostability of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using a new nanoDSF technique for structural assays

Journée IBS, Grenoble, Juin 2018

A. Vermot, I. Petit-Härtlein, M. Thépaut, A. Martel, C. Vivès, C. Breyton, S.M.E. Smith, F. Fieschi

Development of a SANS strategy for the study of membrane proteins: application to a prokaryotic NADPH oxidase homolog

63th Annual meeting of the Biophysical Society - BPS19, Baltimore, Etats-Unis, Mars 2019

A. Vermot, I. Petit-Härtlein, C. Breyton, A. Le Roy, C. Deniaud, M. Thépaut, M. Härtlein, S.M.E. Smith, C. Ebel, A. Martel, F. Fieschi

Thermostability optimization of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using nanoDSF technology for crystallization assays

63th Annual meeting of the Biophysical Society - BPS19, Baltimore, Etats-Unis, Mars 2019

A. Vermot, I. Petit-Härtlein, M. Thépaut, F. Dupeux, C. Vivès, J.A. Márquez, J. Dupuy, S.M.E Smith, F. Fieschi

Development of a SANS strategy for the study of membrane proteins: application to a prokaryotic NADPH oxidase homolog

A. Vermot¹,

I. Petit-Härtlein¹, C. Breyton¹, A. Le Roy¹, C. Deniaud¹,
M. Thepaut¹, M. Härtlein², S. Smith³,
C. Ebel¹, A. Martel¹, F. Fieschi¹

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, IBS, F-38000 Grenoble

²ILL, BP 1566 rue Jules Horowitz, 38042 Cedex 9 Grenoble

³KSU, 1000 Chastain Rd, Kennesaw, GA 30144, USA

annelise.vermot@ibs.fr, franck.fieschi@ibs.fr



NADPH oxidases family : NOX

Professional producers of ROS

NADPH Oxidase Complex

- Flavocytochrome b
- Cytosolic factors
- G proteins

HIGH THERAPEUTIC POTENTIAL

6 TM helices with 2 heme binding regions on helices 3 & 5

Cytosolic domain with FAD and NADPH binding motifs

Search for a prokaryotic homolog of Nox

Transmembrane Helices
Binding Domains : FAD - NADPH
Identification of SpNox

SpNox is well purified by :
• Ni affinity chromatography
• Size exclusion chromatography
• Good Cyt.C reductase activity

Purification of SpNox by Size Exclusion Chromatography using 2x200 columns for SANS experiment - Manual deconvolution of principal peak

MMV Water SpNox Membranes FITC-Water Washing 5200

OBJECTIVES: OBTAIN THE LOW RESOLUTION ENVELOPE OF SpNOX BY SANS

The Instrument – Institut Laue Langevin

SEC-SANS (D22 beamline – ILL)

Neutron → Sample → 2θ < 5° → 2D scattering pattern → Intensity → Global shape (radius of gyration, molecular weight, particle composition) and Details (-nm)

Ab initio model:
• Global shape of SpNox
• Monomeric SpNox

Aggregation and denaturation issues are avoided using an in-situ SEC on SANS

Sample is injected into the loop (1)
• Size exclusion column SEC (2)
• SANS sample cell (3)

Experimental Results

SEC elution profile

Good scattering of the SpNox peak
Twice scattering signal for the shoulder → presence of Dimer

Data analysis

Scattering plot: Successful fit gives the ab-initio envelope.
SpNox is active as a monomer in solution with $R_g = 29.5 \text{ \AA} \pm 0.4$

Low Resolution Envelope

Kratky plot: Normalize the scattering data by the size of the protein.
SpNox is well folded with a little flexibility

Sample optimization for SANS experiments

Non-normalized Ratio vs Temperature (°C)

Tm +10°C, Tagg +20°C

SpNox in MNG3

Contrast Variation experiment

Scattering curves of LMNG micelles in various %D2O

100% H2O: Protein and detergent signals indistinguishable
21% D2O: Cancellation of LMNG signal But low contrast
74 deuterated protein: Good contrast of SpNox against the solvent

Comparison with the homology model of SpNox

Split sequences into TM and DH domains to limit background interferences
Multiple alignment of Nox homologs based on Sequences and Structures
Computational model of DH and TM domain independently

Redesign of SpNox D-loop
Initial D-loop, Redesign D-loop
• Initial D-loop points unrealistically toward the TM helices
• Superlooper: Search for a better candidate into a loop database

Docking
• TM and DH domains docked together by alignment with the existing structure of CsNox
• Includes coordinated Hemes and FAD / NADPH ligands

Homology model of full length SpNox:
• Support for functional and structural understanding
• Molecular replacement

Docking of SpNox molecular modelling in SANS envelope
Computational modelling of SpNox using sequence alignment of DH and TM domains

91% of correlation
DOCKING GIVES A GOOD CORRELATION BETWEEN THE MOLECULAR MODELING AND THE SANS ENVELOPE

Mismatch: Flexibility of SpNox in solution not integrated in the homology model

CONCLUSION

SpNox sample have been optimized for SANS experiments in terms of stability, homogeneity and contrast, allowing to obtain the low resolution envelope of SpNox in which our homology model of SpNox has been successfully docked

Unstable SpNox → Optimization → Stable and contrasted SpNox → SANS + Modelling → Structural model of full SpNox

This study lead to the structural characterisation of a full SpNox protein providing a support to the docking model from TM and DH homology models/structures

THERMOSTABILITY OPTIMIZATION OF A PROKARYOTIC NADPH OXIDASE HOMOLOG USING NANODSF TECHNOLOGY FOR CRYSTALLIZATION ASSAYS



A. Vermot¹,
I. Petit-Härtlein¹, M. Thepaut¹, F. Dupeux¹,
C. Vivès¹, J.A. Márquez, J. Dupuy², S. Smith², F. Fieschi¹
¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, IBS, F-38000 Grenoble
²EMBL Grenoble, 71 Avenue des Martyrs, CS 90181, 38042 Grenoble
³KSU, 1000 Chastain Rd, Kennesaw, GA 30144, USA
annelise.vermot@ibs.fr



NADPH oxidases family : NOX

Professional producers of ROS
NADPH Oxidase Complex
 • Flavocytochrome b
 • Cytosolic factors
 • G proteins

Involvement of eukaryotic NOX :
 Immune Defense, Cell Signaling, Cell Death, Angiogenesis

HIGH THERAPEUTIC POTENTIAL

Search for a prokaryotic homolog of Nox
 Transmembrane Helices
 Binding Domains : FAD - NADPH
 Identification of SpNox

SpNox Purification
 Purification of SpNox by Size Exclusion Chromatography using S200 column - Manual deconvolution of principal peak

SEC-MALLS
 Detergent in the protein/detergent complex
 Homogeneous monomeric SpNox
49,1 kDa **91 Monomers of detergent/protein**

OBJECTIVES: CRYSTALLIZATION AND RESOLUTION OF SpNox STRUCTURE

Thermostability assay using NanoDSF

Detection of intrinsic fluorescence of Trp
 • 330nm in polar env.
 • 350nm in non-polar env.
 • 48 conditions in parallel
 • Insensitivity towards many buffers

Optimization of protein concentration
 Optimal melting curve of SpNox at 1mg/ml
T_m 59°C
 SpNox in detergent

Optimization of protein concentration
 SpNox concentrations: 8.2mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0.8mg/ml
 F350/F330 ratio vs Temperature (°C)

Optimization of SpNox thermostability

[NaCl]
 pH7,5 [NaCl]: 0mM, 250mM, 500mM, 1000mM
 % Denaturation vs Temperature (°C)

pH
 [NaCl] 250mM: pH9, pH8, pH7, pH6, pH5
 % Denaturation vs Temperature (°C)

T_m (°C)
 pH7: T_m vs [NaCl] (mM)
 [NaCl] 250mM: T_m vs pH

SpNox thermostability increases with [NaCl]

Plateau of thermostability between pH4.5 and pH6.5

Diagram of thermostability
 T_m (°C) vs [NaCl] (M) vs pH

THE THERMOSTABILITY DIAGRAM HIGHLIGHTS A STABILITY REGION
 OPTIMAL STABILITY: pH 5-7, NaCl >250mM

Optimization of SpNox enzymatic activity

Cyt.C reductase activity
 [NaCl] 250mM: pH7, pH8, pH9
 Reduced Cyt.C (μM/min) vs Time (s)

Cyt.C reductase activity (mol.Cyt.C/s/mol.SpNox)
 Heatmap of activity vs pH and NaCl

HIGHLIGHTING A RANGE OF pH AND [NaCl] COMBINING STABILITY AND ACTIVITY FOR SpNox PURIFICATION AND STORAGE
 OPTIMAL ACTIVITY: pH 7, NaCl 250mM

SpNox Crystallization

Percentage of hits as a function of the pH
 70% hits between pH5-6

Effect of precipitant on the size and number
 Crystals vs Precipitate

Optimal Conditions
 Refinement of crystallization hits:
 • Salt concentration
 • Precipitant concentration
 Large red hexagonal crystals obtained

4Å diffraction (ESRF beamline ID30-A)
 Hexagonal P6₂₂₂
 2 molecules Asymmetric unit
 a=144.7, b=145.3, c=153.2, α=90°, β=90°, γ=120°

CONCLUSION :

Buffer conditions have been optimized for SpNox conservation to enhance stability and activity. Crystallization assays led to diffracting 4Å crystals

Unstable SpNox → Optimization → Stable SpNox → Crystallization → 4Å Diffracting Crystals

