

Cristallogénèse et structure des macromolécules biologiques

Permanents : A. Aubry (responsable, DR CNRS), B. Vitoux (PR), C. Corbier (M.C.), F. Favier, (M.C.), Claude Didierjean (M.C.), J.P. Mangeot (M.C.), G. Mulliert (M.C.), J.P. Dècle (50%, T1 CNRS), C. Palin(IATOS)

Non-permanents : C. Didierjean (Thèse en 1997), C. Charron (Thèse en 1999), M. Taleb (Thèse en 1999), V. Menchise (Thèse prévue en 2000, en cotutelle avec l'Université de Naples, D. Cobessi (Thèse prévue en 2000), M. Fatih(Thèse prévue en 2000), B. Kauffmann (DEA prévu en 2000)

Le groupe Biocristallographie est l'une des équipes fondatrices de la Fédération de Recherche N° 42 intitulée "Protéines : Modifications naturelles et dirigées, interactions protéine-ligand". Il en constitue la partie "études conformationnelles" aux côtés du groupe Biostructures (UMR 7568) spécialisé dans les études RMN.

Les activités du groupe se sont focalisées dans trois grandes directions qui sont la cristallogénèse des macromolécules biologiques, les études sur les relations structure-fonction d'enzymes et les interactions intermoléculaires pseudopeptide-ligand et protéine-protéine.

A- Cristallogénèse des macromolécules biologiques : utilisation d'un champ électrique externe (M. Taleb (thèse en 1999), C. Didierjean, J.P. Mangeot, C. Jelsch & A. Aubry) (P99-5, A99-2)

Les macromolécules biologiques ainsi que les molécules peptidiques sont composées de la succession de résidus aminoacides comportant des dipôles susceptibles d'être influencés par un champ électrique adéquat. De plus, ces molécules sont souvent placées dans des solvants polaires et/ou des solutions salines en vue de leur cristallisation. Leur charge nette est fonction de leur contenu en résidus polaires et du pH de la solution dans laquelle elles se trouvent. A partir de ces lieux communs on peut imaginer que l'application d'un champ électrique peut soit faire migrer les différents composants des solutions et ainsi conduire à des zones de sursaturation à l'intérieur des milieux de cristallisation, soit influencer la conformation de la molécule au niveau des solutions (et peut être des cristaux) dans certains cas particuliers et notamment au niveau de la conformation des hormones peptidiques (dans ce dernier cas les champs à mettre en œuvre sont considérables). En effet on peut imaginer pouvoir agir par exemple sur le pas des hélices par référence à ce qui semble se passer pour les hélices transmembranaires pour lesquelles l'application d'un champ électrique conduit à changer le diamètre du canal ionique situé le long de l'axe de l'hélice. (Gramicidine A et Alaméthicines) et ainsi permettre le passage des ions de part et d'autre de cette barrière. C'est **un sujet pionnier, totalement original et donc totalement vierge de toute publication** (à part les nôtres).

La cristallisation des macromolécules, comme toute cristallisation, est un processus multiparamétrique incluant les trois étapes classiques de nucléation, croissance et arrêt de croissance. Ce qui différencie la cristallisation des macromolécules est, d'une part, le plus grand nombre de paramètres par rapport à la cristallisation de petites molécules et, d'autre part, les propriétés physico-chimiques particulières de ces composés.

Parmi les différentes méthodes de cristallisation des macromolécules la méthode par diffusion de vapeur est certainement la plus utilisée dans le monde en application des techniques de goutte

suspendue ou assise. Cette méthode a été utilisée abondamment dans ce travail ainsi que des méthodes dites "batch" dans lesquelles, au contraire, aucune diffusion de vapeur n'est permise.

La protéine modèle choisie est le lysozyme qui présente certains avantages comme son prix abordable, sa facilité de cristallisation sous une grande variété polymorphique, dans un grand domaine de pH et avec l'ajout d'une grande variété d'agents cristallisants. Le domaine d'expérimentation est donc très large avec cette protéine. Le fait que son point isoélectrique soit élevé (11,3) est également un avantage certain car cela va permettre d'étudier l'effet de la charge dans une grande gamme de pH. Ainsi, plus le pH de la solution sera éloigné de 11,3, plus la charge nette globale de la protéine sera élevée (de l'ordre de +13,6 à pH 4,5).

Toutes les expériences ont été réalisées simultanément sans champ électrique et avec champ dans une même pièce thermostatée à 20°C. Les premières études réalisées ont concerné l'état dissous en vue de mettre en évidence l'effet d'un champ électrique externe (c'est à dire nécessitant un montage interdisant tout contact entre la solution protéique et les électrodes) sur une solution protéique. Deux appareillages ont été construits et ont permis de montrer sans ambiguïté que:

A-1 Le champ électrique conduit à une variation des concentrations en protéine dans la solution au voisinage des électrodes.

L'appareil utilisé est représenté sur la figure 1a. La forme en toit d'usine permet de limiter les courants de convection dans la cuve. Un champ électrique de 7500V/cm a été appliqué à différentes solutions de lysozyme, de concentration initiale 25 mg/ml. La première a été tamponnée à pH 4,5, la seconde à pH 7,5 et la troisième à pH 4,5 en présence de 26% de PEG 400 (milieu visqueux). Chaque expérience a été répétée à différentes concentrations en NaCl. Les concentrations ont été mesurées, après un temps d'équilibre de deux heures, à proximité immédiate des électrodes. La figure 1b montre les résultats obtenus pour la solution protéique à pH 4,5 en fonction de la concentration en NaCl. Il est clair que la concentration en lysozyme augmente du côté de la cathode (la charge de la macromolécule est fortement positive à ce pH). Le phénomène observé est le même dans le cas de la solution à pH 7,5 et de la solution visqueuse à pH 4,5 (non représenté ici), avec cependant une diminution notable de la différence entre les concentrations observées au niveau de chaque électrode. Dans tous les cas, l'écart diminue avec l'augmentation de la concentration en sel.

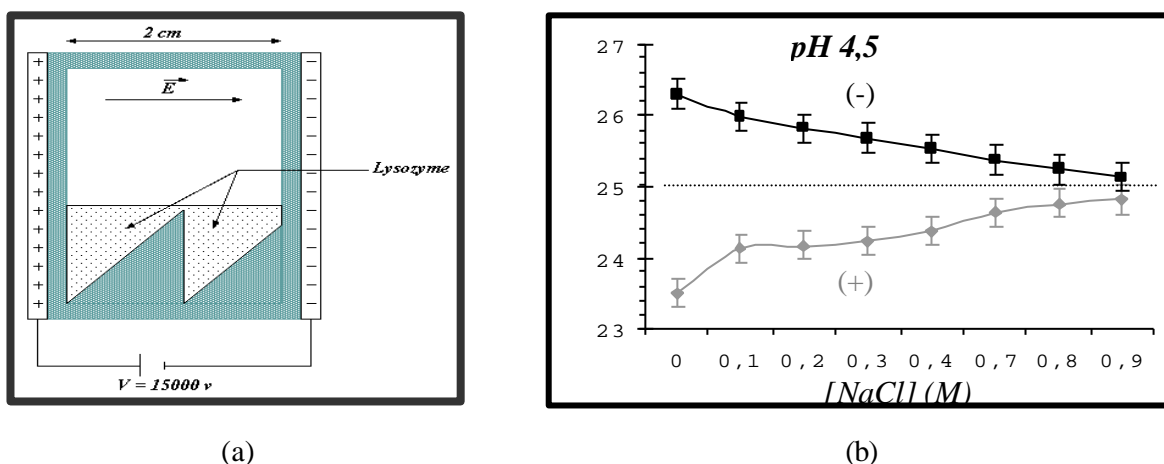


Figure 1 : La concentration en lysozyme a été mesurée après 2 heures. Les prélèvements ont été faits au voisinage immédiat des électrodes. La figure 1b montre les concentrations en protéine mesurées pour différentes concentrations en sel, à pH 4,5.

Cette première série d'expériences montre que cette macromolécule est sensible au champ électrique et que cette sensibilité dépend des conditions de pH, de sel et d'agent précipitant.

A-2 Le champ électrique n'influe pas sur la position de la courbe de solubilité de la protéine à l'équilibre mais accroît considérablement la vitesse d'atteinte de cet équilibre.

Ce résultat est important car les molécules à cristalliser dans ce domaine des Sciences de la Vie ont souvent des durées d'existence relativement courtes.

L'enceinte fermée (Figure 2) est munie d'un couvercle de petite dimension permettant d'effectuer des prélèvements de solution protéique *in situ* au sommet de la goutte. La méthode de cristallisation est la méthode batch dans laquelle les tampon et concentration en sel sont identiques dans la goutte et dans le puits. Ce montage permet donc de mesurer la concentration de la protéine pendant la cristallisation sans interrompre le champ électrique.

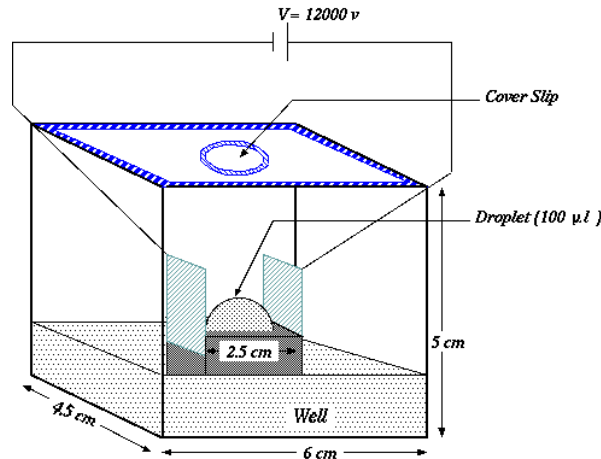


Figure 2 : Dispositif permettant l'étude de la solubilité d'une macromolécule sous champ électrique. La méthode utilisée est la méthode batch.

Le tableau ci dessous donne les concentrations de départ en lysozyme en fonction de la concentration en sel. Trois séries d'expériences ont été réalisées avec des points de départ différents pour les concentrations en protéine (trois séries de quatre gouttes) de sorte à balayer le plus large domaine possible de la courbe de solubilité.

Concentrations initiales en NaCl	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3
0,4 M	96,07 mg/ml	71,55 mg/ml	64,75 mg/ml
0,7 M	64,75 mg/ml	45,25 mg/ml	22,215 mg/ml
1 M	22,215 mg/ml	8 mg/ml	5,4 mg/ml
1,5 M	10 mg/ml	7,25 mg/ml	6,35 mg/ml

Ces gouttes sont toutes pourvues de cristaux (avec et sans champ) lors de la première mesure mais ne sont pas encore parvenues à l'équilibre. Les mesures de concentration en protéine ont été effectuées après un mois et ensuite toutes les deux semaines afin de comparer l'effet du champ électrique sur le niveau de convergence des concentrations (voir expériences a, b et c sur la figure 3 ci-dessous).

Les valeurs mesurées des concentrations résiduelles en lysozyme après 4, 6 et 10 semaines sont toujours plus basses sous champ pour les faibles concentrations en sel, indiquant ainsi une accélération de la cristallisation. Pour les fortes concentrations en sel les effets sont peu sensibles ce qui peut s'expliquer par un fort écrantage de la protéine par les ions salins.

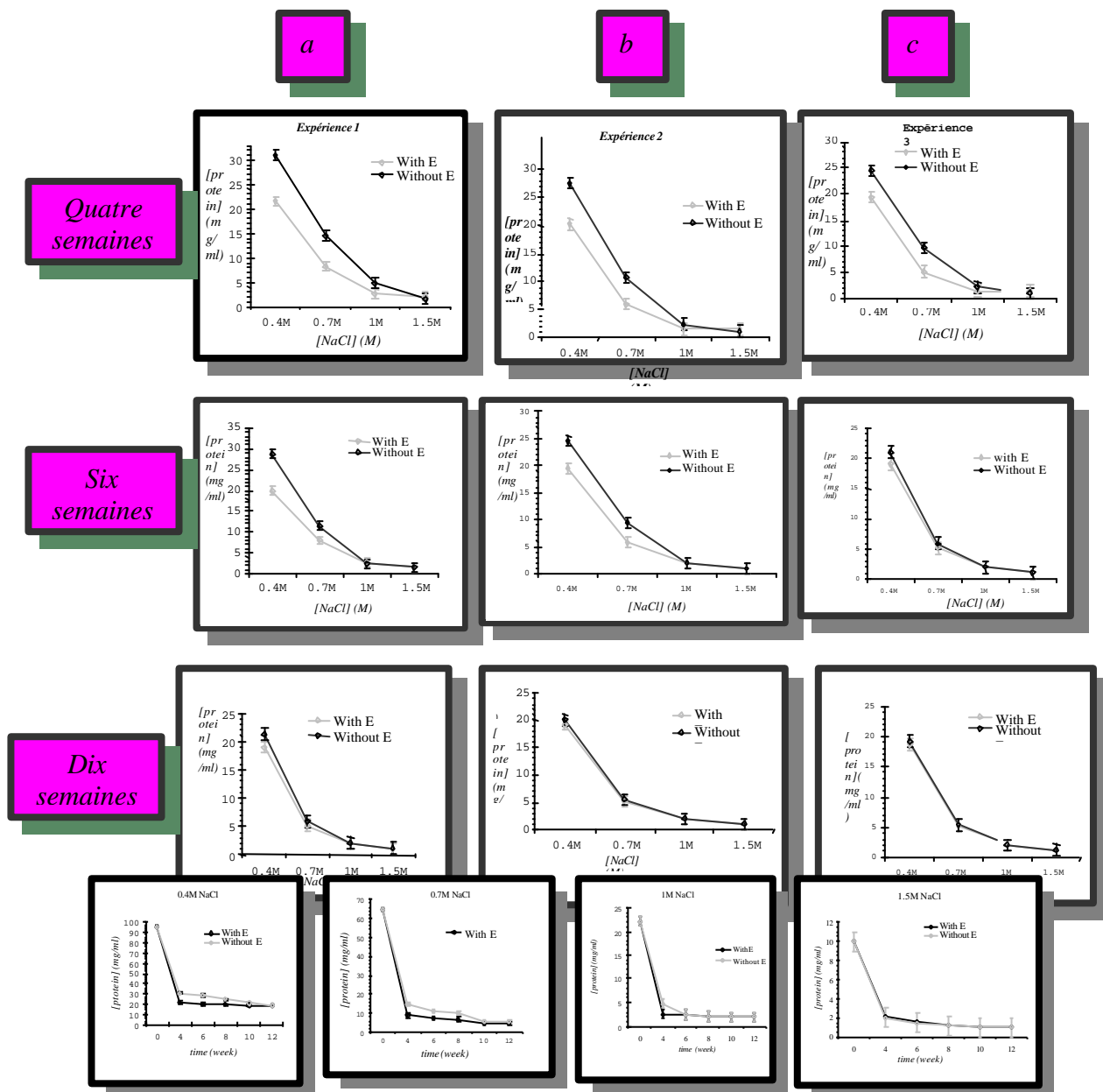


Figure 3 : Courbes montrant les concentrations mesurées dans les différentes gouttes après 4, 6, et 10 semaines. La dernière ligne de graphiques est une représentation de la concentration en lysozyme en fonction du temps, aux 4 concentrations en sel.

Les courbes montrent que l'effet du champ électrique est inversement proportionnel à la force ionique de la solution saline et que l'équilibre est atteint beaucoup plus rapidement sous champ. Lorsque l'équilibre est atteint (après 12 semaines) on constate que la solubilité est restée la même avec et sans champ électrique. Donc l'application du champ électrique, lors de la cristallisation du lysozyme, permet un gain de temps pour atteindre l'équilibre mais ne semble pas modifier celui-ci.

Après ces premiers résultats encourageants, car montrant indubitablement qu'un champ électrique externe est capable de perturber le comportement d'une solution cristallisante, nous nous sommes intéressés à la cristallisation elle-même pour étudier l'influence d'un tel champ au niveau de la production et de la qualité des cristaux.

Des solutions à différentes concentrations en protéine sont préparées (40 mg/ml, 30 mg/ml et 20 mg/ml) dans un tampon acétate de sodium à pH 4,5. Les solutions salines sont préparées dans le

même tampon avec 0,5 M, 0,6 M et 0,7 M NaCl. Toutes les expériences sont réalisées avec et sans champ électrique. Le montage en gouttes suspendues utilisé est équivalent à un macro condensateur. Une boîte Linbro (boîte de culture cellulaire) est placée en sandwich entre deux plaques métalliques distantes de 2,5 cm (Figure 5). La tension maximale initialement disponible était de 5000V ce qui donne un champ maximal entre les électrodes de 2000V/cm.

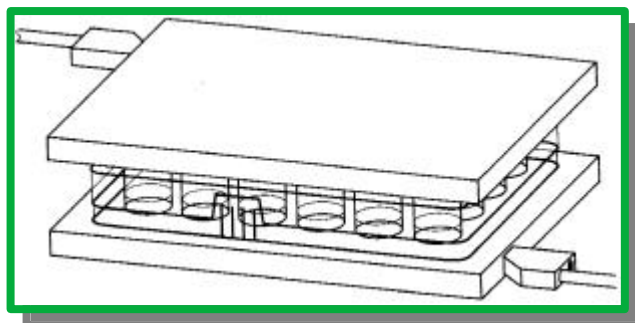


Figure 5 : Montage "sandwich" d'une boîte de culture cellulaire de type Linbro

De nombreux essais ont été réalisés avec champ et sans champ. L'examen macroscopique des gouttes qui toutes contiennent des cristaux ne révèle pas de différences importantes. La position des cristaux dans les gouttes est similaire. Cependant, il semble que la cristallisation sous champ ait une légère tendance à diminuer le nombre de cristaux dans les gouttes. Les qualités cristallines ont été mesurées au LURE sur la ligne D25, ligne spécialisée dans la topographie X avec un rayonnement rigoureusement monochromatique et parfaitement parallèle permettant des mesures hyper fines de profils de Bragg. Des mesures ont été effectuées sur 33 cristaux obtenus sous champ et 34 sans champ. Les résultats montrent que la moyenne des largeurs de raies est légèrement inférieure avec champ (11,9'') que sans champ (13,9'') et que les écarts types sont vont dans le même sens (5,7'' et 7,4'' respectivement).

Le pic le plus petit a été trouvé pour un cristal obtenu sous champ électrique, sa largeur est de 3,6 secondes d'arc. Cette valeur constitue un record de finesse qui n'est toujours pas égalé à notre connaissance.

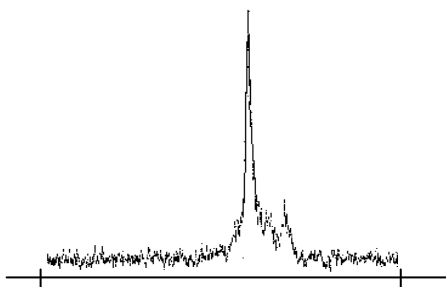


Figure 6 : Largeur de raie de 3,6'' observée sur un cristal de lysozyme obtenu par croissance sous un champ électrique externe

Les différences entre les deux types de cristallisation (avec et sans champ) ne sont pas spectaculaires mais montrent un effet du champ électrique sur la qualité des cristaux. Le champ électrique semble donc jouer un rôle dans le processus de nucléation et de croissance. Les milieux diélectriques utilisés (plastique de la boîte Linbro, verre de lamelle, liquide du puits, air) atténuent probablement la valeur du champ effectivement appliqué sur la goutte dans ce système. Ceci nous a incité à développer un autre montage, en goutte assise, dans lequel les écrans diélectriques sont réduits (Figure 7). La goutte assise sur son support est placée entre deux plaques métalliques distantes de 0,5 cm. Le champ électrique appliqué est horizontal. La tension limite applicable est de l'ordre de 1000V. Une valeur supérieure à 1000V conduit à un déplacement de la goutte.

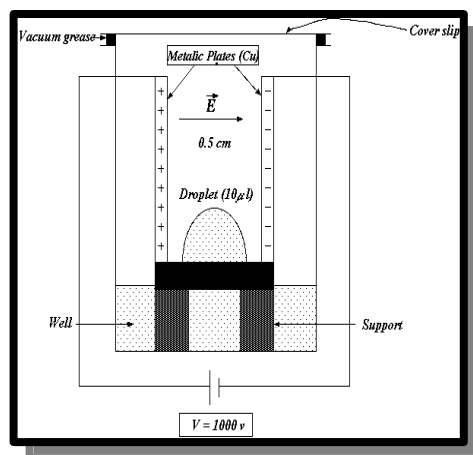


Figure 7 : Dispositif de cristallisation en goutte assise sous champ électrique permettant la minimisation des diélectriques entre la goutte et les électrodes.

Les expériences de cristallisation réalisées avec ce montage en goutte assise ont été répétées 32 fois à deux concentrations en agent précipitant (0,6 M et 0,7 M de NaCl) avec et sans champ électrique. Les solutions de protéine sont préparées à 40 mg/ml dans du tampon acétate de sodium (50mM) à pH 4,5 et dans du tampon Tris (0,1M) à pH 7,5. Dans chaque goutte, après cristallisation, un comptage des cristaux et la mesure de la plus grande dimension du plus grand cristal ont été effectués. La statistique des 32 expériences est représentée sur les graphes des figures 8a et 8b. Des photos ont été prises (Figure 9) pour les deux cas (avec champ et sans champ), permettant ainsi une bonne comparaison.

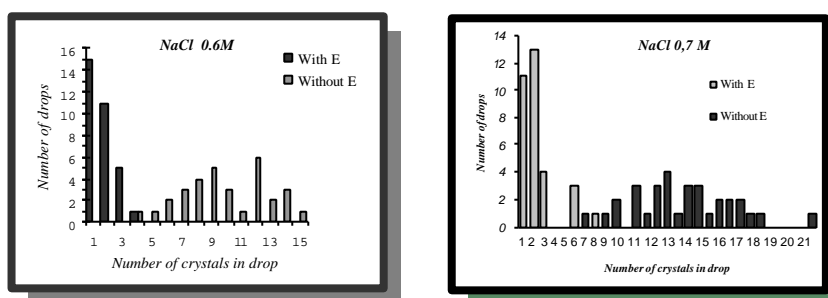


Figure 8a : Nombre de cristaux obtenus par goutte à pH 4,5 pour deux concentrations en sel.

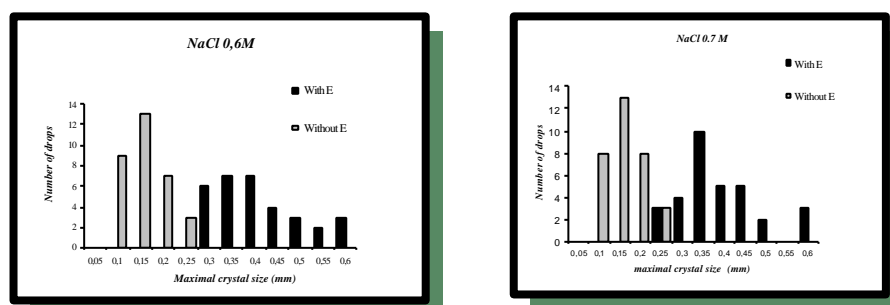


Figure 8b : Plus grande taille du plus grand cristal pour chaque goutte et pour deux concentrations en sel.

Les deux graphes de la figure 8a montrent sans ambiguïté que **l'application d'un champ électrique permet de diminuer considérablement le nombre de cristaux** dans les gouttes et même de n'obtenir fréquemment qu'un seul cristal par goutte. Ce résultat est important car il a comme corollaire que **la taille des cristaux augmente** sous champ électrique, comme le montrent les deux graphes figure 8b.

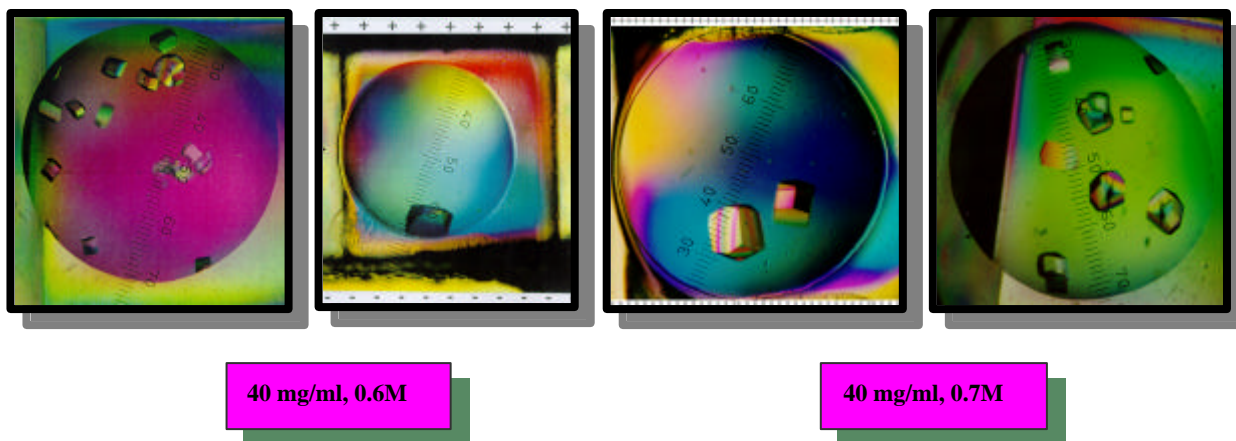


Figure 9 : Photos montrant l'effet d'un champ électrique externe sur la cristallisation du lysozyme à pH 4,5 et pour deux concentrations en NaCl. Les résultats obtenus sous champ sont sur les deux photos centrales.

Dans les gouttes sans champ, les cristaux n'ont pas de position particulière (Figure 9) alors que sous champ les cristaux apparaissent plutôt au voisinage du pôle négatif, en surface de goutte. La protéine utilisée a un point isoélectrique voisin de 11 et est donc chargée positivement au pH de cristallisation. On pouvait donc effectivement espérer une migration des molécules vers la cathode et donc une sursaturation locale dans cette zone, conduisant à une cristallisation.

Dans le cas d'une cristallisation à pH 7,5, les résultats ne sont pas fondamentalement différents avec et sans champ. A ce pH la charge de la protéine est beaucoup plus petite (les valeurs de ces charges sont de 13,6 à pH 4,5 et de 7,6 à pH 7,5) et il faudra appliquer un champ beaucoup plus fort pour retrouver des résultats comparables aux précédents.

Le montage précédent est plus performant que le simple montage de la boîte Linbro prise en sandwich entre les deux électrodes mais montre cependant ses limites par le déplacement de la goutte vers les électrodes dès que le champ appliqué dépasse une certaine limite. Un autre système a donc été développé pour appliquer un gradient de champ électrique sur une solution préparée en vue d'une cristallisation en batch (Figure 10).

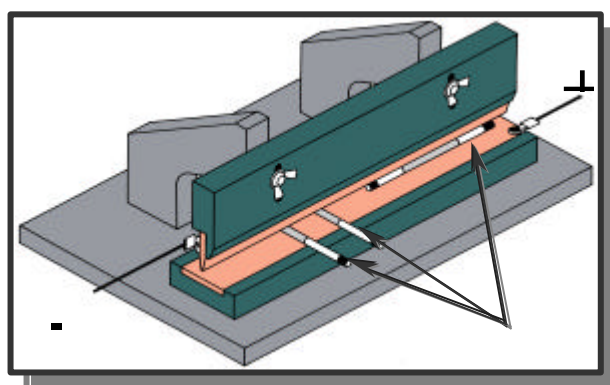


Figure 10 : Dispositif original permettant l'application d'un champ électrique sur une cristallisation en batch. Les tubes contenant la solution peuvent être placés le long de l'électrode ou perpendiculairement à celle-ci.

Des tubes en verre contenant des solutions de concentration 20mg/ml en lysozyme et 0,5M en sel sont placés soit perpendiculairement, soit parallèlement à la cathode. Des tubes de contrôle, qui ne sont pas soumis au champ électrique sont préparés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont montrés sur les photographies de la figure 11.

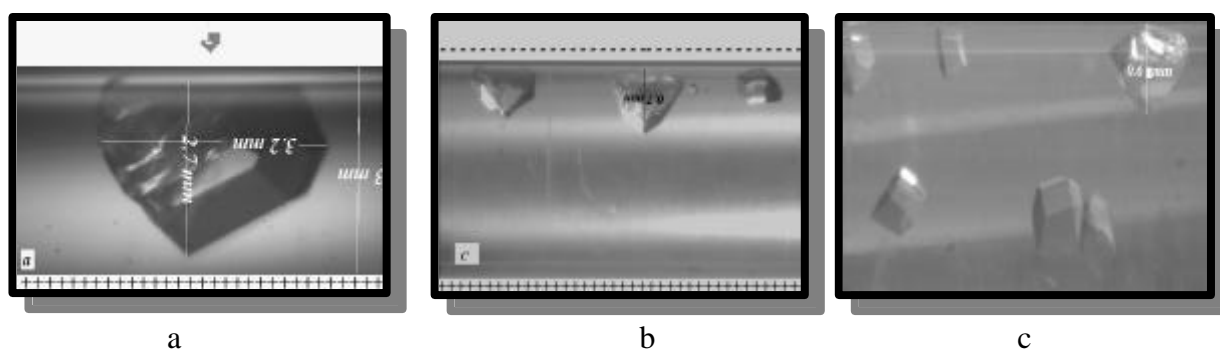


Figure 11 : Photos des cristaux obtenus avec la méthode batch dans le tube placé perpendiculairement à la cathode (a), le long de la cathode (b) et sans champ (c). La valeur du champ est de l'ordre de 2500V/cm.

Dans les tubes soumis à un champ électrique les cristaux apparaissent en haut et au niveau de la cathode, tandis que sans champ électrique les cristaux apparaissent dans le volume du tube. La photo (a) montre un cristal obtenu avec champ électrique dans un tube posé perpendiculairement à la cathode. Dans le cas où le tube serait parallèle à celle-ci les cristaux apparaissent le long du tube du côté du pôle négatif (b). Lorsque le champ n'est pas appliqué les cristaux apparaissent au hasard dans le tube (c).

D'un point de vue théorique, le potentiel électrostatique a été calculé dans une goutte sphérique, mimant le milieu de cristallisation, placée entre deux électrodes. L'équation de Poisson-Boltzmann a été résolue dans ce cas et le potentiel a été tracé avec l'aide d'une version modifiée du programme DELPHI (*K Sharp & b Honig. Electrostatic interactions in macromolecules : theory and application. Ann. Rev. Biophys. Chem. 1990, 19: 301-332*) (figure 12)

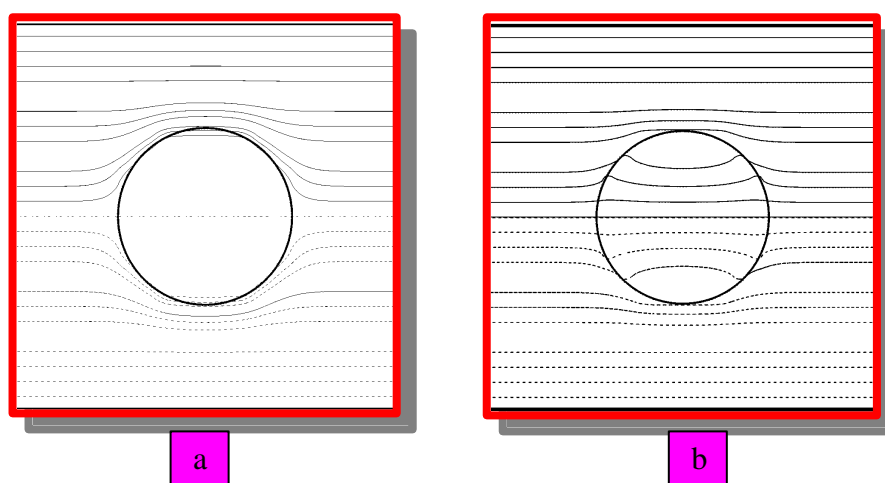


Figure 12 : Modélisation du potentiel électrostatique dans une goutte de cristallisation sphérique prise en sandwich entre deux électrodes : a) milieu aqueux conducteur, b) milieu diélectrique non-conducteur.

Ces calculs montrent que l'effet du champ est maximum en surface de goutte dans un milieu aqueux et décroît très rapidement vers l'intérieur. Ce résultat est en conformité avec notre observation de l'apparition des cristaux en surface de goutte. Nos expériences concernant les milieux diélectriques sont encore trop fragmentaires pour en tirer des comparaisons avec la théorie.

En conclusion de ces résultats, les expériences réalisées ont mis en évidence des comportements originaux par rapport aux cristallisations classiques :

- L'étude de solutions de cristallisation soumises à un champ électrique montre que l'effet de ce champ est maximal à faible force ionique.

- Le champ électrique appliqué, lors de la cristallisation du lysozyme, ne semble pas agir sur la solubilité de cette protéine mais permet un gain important de temps pour atteindre l'équilibre.
- Le champ électrique agit sur la protéine chargée en solution en générant un gradient de concentration. Ainsi il induit la formation de sites de germination uniquement au voisinage de la cathode et en surface de la goutte. Dans le cas particulier du lysozyme (chargé positivement à pH 4.5) cette germination est localisée du côté du pôle négatif.
- Les études topographiques montrent que les cristaux obtenus sous champ électrique sont de meilleure qualité cristalline que ceux obtenus sans champ.
- La méthode en batch permet d'appliquer un champ important et par suite **d'obtenir des cristaux de grande taille**, probablement utilisable pour la diffraction des neutrons.
- Enfin, et c'est peut être le plus important, **l'application d'un champ électrique permet de réguler le nombre de cristaux par goutte** dans les cas favorables.

En prospective de ce travail, énormément reste à faire :

- Dans le domaine du choix des matériaux à cristalliser, il est évident que de nombreux essais devront être réalisés avec des protéines diverses (globulaires, fibreuses, membranaires, etc.) et des milieux de cristallisation variés (milieux polaires, non polaires visqueux, etc.). Par exemple, des collaborations sont en cours d'élaboration sur la cristallisation d'une protéine membranaire avec le département de biologie cellulaire et moléculaire du CEA à Villefranche sur mer. Des essais de cristallisation de la thaumatococine sont en cours dans le cadre du programme PCV avec R. Giégé de l'IBMC de Strasbourg (UPR "SMBMR").
- Dans le domaine de la systématique de cristallisation utilisant les matrices classiques d'essais, nous sommes en train de développer des systèmes dans lesquels une application d'un champ électrique intense sera aisée en routine. Si ces systèmes fonctionnent correctement nous proposerons de les breveter.
- Un certain nombre d'équipements est nécessaire pour pousser nos investigations. Un système de diffusion de lumière est indispensable si l'on veut regarder finement ce qui se passe au niveau des agrégations avec et sans champ. Dans le même domaine, une saisie régulière d'images de cristaux en croissance permettra de comparer finement les cinétiques en présence et en absence de champ électrique.
- Une combinaison de l'effet du champ électrique avec d'autres facteurs physiques, comme le champ magnétique, la pression (contrat PCV avec R. Giégé, IBMC, Strasbourg) ou la microgravité, est envisageable pour avoir des cristaux de meilleure qualité.

B- Relations structure-fonction dans les enzymes

Cette partie des activités du groupe Biocristallographie fait appel à la détermination des structures de mésomolécules et de macromolécules par diffraction X. Les enregistrements des diagrammes de diffraction ont été réalisés au Service Commun de Diffraction X de notre Université (Service géré par le LCM3B et équipé notamment d'une anode tournante et d'un système "image plate" de 30 cm) et sur les synchrotrons français et européens (LURE, ESRF, DESY) pour les mesures à haute résolution et MAD. Toutes les recherches présentées ont été développées dans le cadre de programmes Physique et Chimie du Vivant du CNRS et/ou de la FR 42. Les principales collaborations sont avec le groupe d'Enzymologie de G. Branlant (UMR 7567) et le groupe de Biologie Forestière de J.P. Jacquot (UHP Nancy I). Quatre thèses portent sur cette partie des recherches. Deux ont été soutenues (1997 et 1999) et deux le seront cette année. Pour plus de détails, le lecteur pourra se reporter aux publications P97-9, P99-7 et 8, P00-5 et 6, P00-25, A99-1 et 3.

B-1 Caractérisation des facteurs moléculaires responsables de la reconnaissance des cofacteurs NAD/NADP (C. Didierjean (thèse en 1997), C. Charron (thèse en 1999), D. Cobessi, F. Favier, C. Corbier, B. Vitoux et A. Aubry)

La fonction biologique de très nombreuses enzymes appartenant à la famille des aldéhydes déshydrogénases implique une interaction spécifique avec un dinucléotide à pyridine. Les aldéhydes déshydrogénases utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) ne sont en général pas impliquées dans les mêmes voies métaboliques que celles utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP). Le coenzyme NAD intervient le plus souvent dans les voies cataboliques (dégradation) alors que le NADP intervient dans les voies anaboliques (synthèse). Ces cofacteurs se distinguent par la présence (NADP) ou l'absence (NAD) d'un groupement phosphate supplémentaire en position 2' du ribose adjacent à l'adénine (Figure 13). Depuis une quinzaine d'années, de nombreuses équipes de recherche ont tenté de comprendre pourquoi deux enzymes structurellement proches présentaient des spécificités de cofacteur différentes. Structuralement, la plupart des déshydrogénases à NADP possèdent comme domaine de fixation du cofacteur un motif de repliement classique constitué de brins β parallèles entourés d'hélices α (domaine de Rossmann). Les alignements de séquences à travers les différentes familles de déshydrogénases possédant ce repliement révèlent une empreinte générale caractérisée par la succession d'acides aminés GXGXXG/A. Sur le plan structural, elle se situe dans la boucle reliant le premier brin β à la première hélice α . Cette boucle interagit avec le groupement pyrophosphate des cofacteurs NAD ou NADP se fixant au domaine de Rossmann.

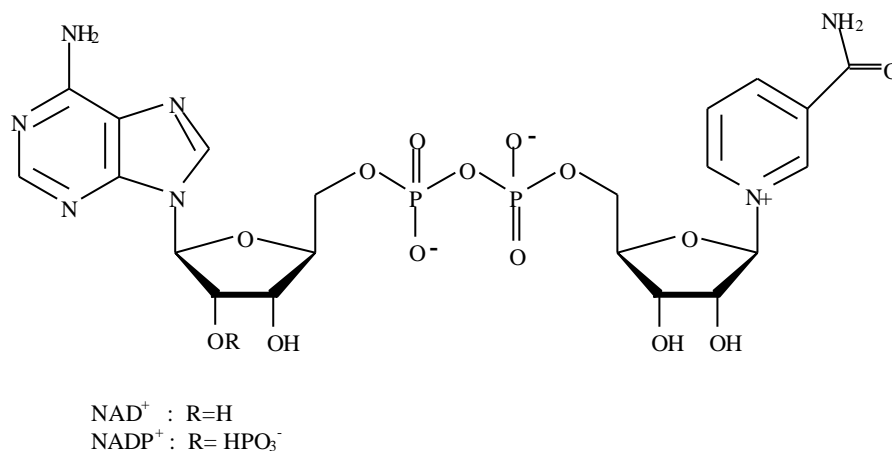


Figure 13 : Schéma développé du NAD⁺ et du NADP⁺

Cet axe de recherche vise à caractériser les facteurs structuraux impliqués dans la reconnaissance du cofacteur et gouvernant la spécificité vis-à-vis du NAD ou du NADP. Dans le cadre de ce projet, nous avons déterminé la structure de complexes enzyme/NADP de mutants d'une ALDH phosphorylante bactérienne dont la spécificité de cofacteur (NAD dépendante) avait été modulée, voire inversée par mutagenèse dirigée. Nous avons également déterminé la structure d'une ALDH phosphorylante d'archaebactérie, qui est; elle, NADP spécifique, ainsi que d'une ALDH non phosphorylante, elle aussi NADP spécifique. Les principales conclusions sont présentées ci-dessous.

B-1.1 Reconnaissance spécifique des cofacteurs NAD/NADP par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

Le but de cette étude est de comprendre d'un point de vue structural la spécificité de cofacteur dans les déshydrogénases à NAD(P). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est un modèle intéressant car selon sa localisation subcellulaire elle est soit strictement NAD dépendante (GAPDH glycolytique), soit à dualité de cofacteur NAD(P) (GAPDH chloroplastique). Des essais de mutagenèse dirigée ont été réalisés sur la GAPDH de *B. stearotherophilus* strictement NAD dépendante dans le but de créer une enzyme capable de fixer préférentiellement le NADP. Les connaissances de la structure tridimensionnelle de cette enzyme et des structures primaires des GAPDH chloroplastiques ont été utiles pour réaliser ce remodelage protéique.

Deux mutants ont été retenus pour notre étude cristallographique : le triple mutant D32G, L187A et P188S (noté D32G-S) présentant une inversion de spécificité de NAD vers NADP par rapport à l'holoenzyme de type sauvage et le quintuple mutant L33T, T34G, D35G, L187A, P188S (noté B-S) conçu pour mimer le site du fixation du cofacteur de la GAPDH chloroplastique. Pour chacun des mutants, les structures des complexes mutant-NAD (notées D32G-S_n et B-S_n) et mutant-NADP (notées D32G-S_p et B-S_p) ont été résolues, afin de comparer les structures d'une même enzyme complexée avec deux cofacteurs différents.

Les résultats structuraux sur le triple et le quintuple mutant complexés avec NADP apparaissent en parfait accord avec ceux obtenus par nos collaborateurs en enzymologie et par RMN du phosphore 31. Dans le cas du complexe D32G-S_p, l'élimination du résidu Asp 32 favorise l'état dianionique du 2'-phosphate qui se stabilise en formant de nombreuses interactions en particulier avec la sérine 188 (Figure 14). Ce processus rend compte de la bonne affinité du triple mutant pour NADP. Dans le quintuple mutant, l'acide aspartique 32 se comporte comme un antidéterminant de type électrostatique pour la fixation du NADP. En effet, le 2'-phosphate pointe vers le solvant et ne forme aucune interaction avec la protéine dans la structure du complexe B-S_p.

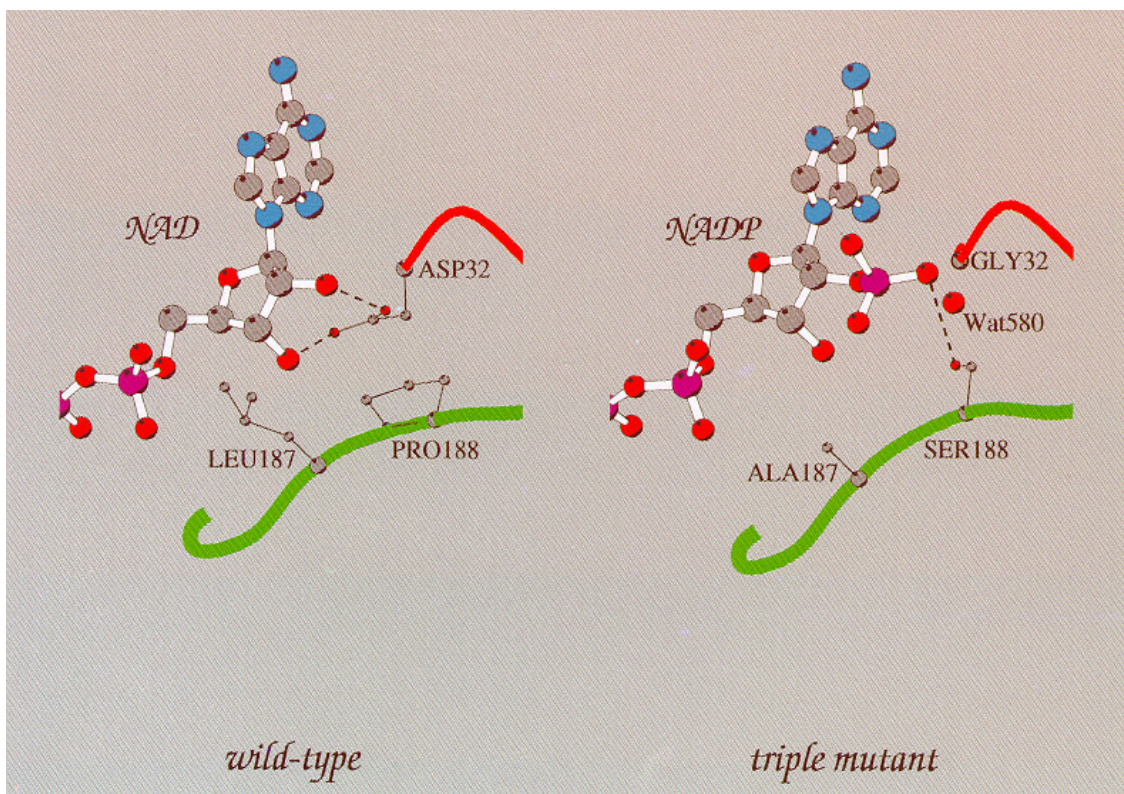


Figure 14 : Figure montrant l'effet positif de la triple mutation D32G, L187A, P188S sur l'affinité de la GAPDH de bacillus stearotherophilus pour le cofacteur NADP.

La comparaison des structures D32G-Sn et B-Sn avec celle de l'holoenzyme de type sauvage a permis d'expliquer la baisse d'affinité de ces mutants pour NAD⁺. La plus forte baisse d'affinité observée dans le triple mutant D32G-S s'explique principalement par le manque d'interaction directe entre la protéine et le ribose de l'adénosine du NAD. L'augmentation notable de la constante de dissociation du NAD dans le quintuple mutant B-S semble être liée à deux effets : le carboxylate de l'acide aspartique 32, en formant une interaction supplémentaire dans la structure du complexe B-Sn, atténue probablement ses contacts avec les hydroxyles du ribose de l'adénosine ; le cycle adénine pris en tenaille par les résidus Thr96 et Leu33 dans l'holoenzyme de type sauvage apparaît moins bien stabilisé par la Thr33 dans le mutant B-S.

Une comparaison des structures tridimensionnelles des aldéhydes déshydrogénases complexées avec NADP connues à ce jour a montré que la reconnaissance du cofacteur était principalement liée à la présence d'une arginine. Celle-ci est impliquée dans la stabilisation du groupement 2'-phosphate ainsi que dans la stabilisation du cycle adénine par contact π - π . Cependant, des études récentes alliant mutagenèse dirigée et enzymologie, ont permis de mettre en évidence l'importance d'un résidu à chaîne hydroxylée dans la fixation du cofacteur NADP. Il n'est donc pas étonnant de trouver dans la structure du complexe D32G-Sp la sérine 188 comme seul résidu en interaction avec le 2'-phosphate. Néanmoins, même si ce mutant présente une bonne affinité pour NADP, son activité est diminuée d'un facteur 5 par rapport à celle observée dans l'holoenzyme de type sauvage active avec NAD. Cette baisse d'activité est probablement liée à des effets à longue distance impliquant des résidus difficiles à mettre en évidence à l'intérieur de complexes simplement binaires (enzyme-cofacteur).

B-1.2 Description du site de fixation du cofacteur de la GAPDH NADP dépendante de Methanothermus fervidus

Methanothermus fervidus est une archaebactérie hyperthermophile. Contrairement aux GAPDH glycolytiques d'eucaryotes et d'eubactéries qui sont strictement NAD dépendantes, la GAPDH de *M. fervidus* est capable d'utiliser les deux cofacteurs (NAD et NADP), avec une préférence marquée pour le NADP. Les GAPDH d'archaebactéries possédant une identité de séquence très faible (9-16%) avec les GAPDH d'autres organismes, il était donc impossible d'utiliser un modèle basé sur la connaissance de la structure tridimensionnelle d'autres GAPDH permettant de proposer des hypothèses pouvant expliquer la différence de spécificité de cofacteur. Nous avons déterminé la structure cristalline de la GAPDH de *M. fervidus* complexée avec le NADP. Une structure de GAPDH d'archaebactérie (*S.solfataricus*) (Isupov et al., 1999, *J. Mol. Biol.* **291**, 651-660) a récemment été publiée dans laquelle l'enzyme est sous forme apo (absence de tout cofacteur). **Notre structure constitue donc le premier exemple de GAPDH d'archaebactérie en présence d'un cofacteur et nous a permis d'élucider les facteurs structuraux responsables de la spécificité que présente l'enzyme vis-à-vis du NADP.** L'examen de cette structure et la comparaison avec les structures de GAPDH NAD dépendantes montrent que les principaux déterminants sont les suivants :

a) Une S loop plus petite

Pour l'enzyme de *B. stearothermophilus*, les résidus Pro188 et Leu 187 positionnés dans le milieu de la S-loop empêchent la fixation du NADP par encombrement stérique et semblent constituer l'un des déterminants principaux de la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du NAD. La structure de l'enzyme de *M.fervidus* confirme cette conclusion. En effet, la S-loop est beaucoup plus courte que celle des GAPDH d'autres sources, et pointe par ailleurs dans une direction différente qui n'interfère donc pas avec la fixation du NADP.

b) *Un résidu basique qui stabilise la présence du groupement 2' phosphate*

Dans l'enzyme de *M. fervidus*, le résidu Asp est remplacé par une lysine dont la chaîne latérale est décalée par rapport au ribose de l'adénine. Cela permet au 2'phosphate du complexe enzyme/NADP d'occuper l'espace correspondant à la position de la chaîne latérale de l'aspartate dans les structures protéine/NAD. De plus, le groupement ammonium de la lysine forme un double pont salin avec le groupement 2'phosphate et stabilise ainsi fortement le complexe comme le confirment les études faites par mutagenèse dirigée (Talfournier et al., 1999, *Eur. J. Biochem.* **265**, 93-104).

c) *Une liaison hydrogène via le résidu Thr34*

Le résidu Thr 34 de l'enzyme de *M. fervidus* est l'équivalent structural du résidu Leu 33 de l'enzyme de *B. stearotherophilus*. Dans les deux structures, ce résidu participe à la stabilisation de la partie adénosine via une interaction hydrophobe. Cependant, le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la Thr dans l'enzyme de *M. fervidus* forme une liaison hydrogène avec le groupement 2'phosphate du NADP et contribue donc également à la spécificité vis-à-vis de ce cofacteur (Figure 15).

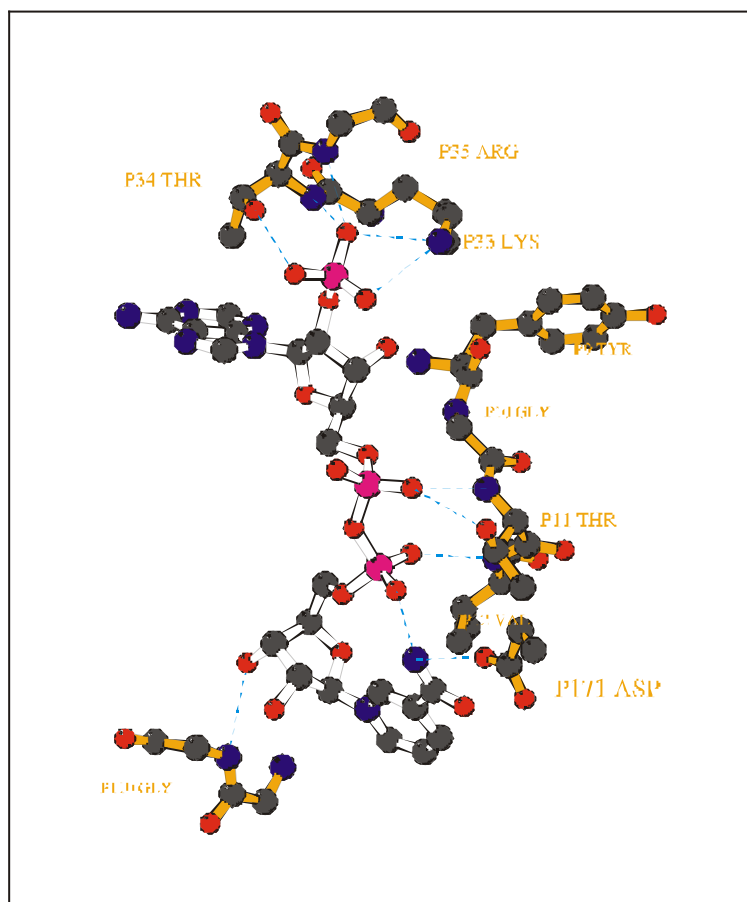


Figure 15 : Schéma représentant le site de fixation du cofacteur dans la GAPDH de *M. fervidus*

B-1.3 *Spécificité de cofacteur dans les ALDH non phosphorylantes*

Les deux études précédentes portaient sur une classe particulière d'ALDH (ALDH phosphorylante). Nous avons voulu élargir cette étude à la seconde classe d'ALDH (ALDH non phosphorylante) avec comme modèle l'ALDH non phosphorylante de *Streptococcus mutans*.

Au moment où nous avons entrepris ce travail, trois structures d'ALDH non phosphorylantes NAD dépendantes étaient connues, mais aucune d'ALDH non phosphorylante NADP dépendante. Notre étude constitue cette fois encore **le premier exemple de structure d'ALDH non phosphorylante NADP dépendante, aussi bien sous forme apo que complexée avec le NADP.**

Le premier point important qui ressort de cette étude et des résultats de Liu *et al.* (1997, *Nat. Struc. Biol.*, 4, 317-326) est que la fixation du cofacteur NADP au domaine de Rossmann de l'ALDH de *S. mutans* est totalement différente de celle observée chez les autres déshydrogénases n'appartenant pas à la famille des ALDHs. Le cofacteur ne s'étend pas perpendiculairement par rapport au plan du feuillet β parallèle, mais l'enjambe. Ce nouveau mode de fixation trouve probablement son origine dans l'orientation et dans la longueur de la première boucle du domaine de Rossmann (publication P99-7). La superposition du domaine à celui de plusieurs déshydrogénases NAD(P) dépendantes montre que la boucle située entre le premier brin β et la première hélice α est plus longue dans le cas des ALDHs. Sa longueur ainsi qu'une proline, Pro156 chez *S. mutans*, sont conservées chez les ALDHs. Cette particularité semble être un élément structural important pour l'acte catalytique car il permet des mouvements du cofacteur.

En ce qui concerne la spécificité de cofacteur, l'examen des structures d'ALDH NAD dépendantes existantes montrent qu'il n'existe pas un espace suffisant pour placer le groupement phosphate supplémentaire du NADP. De plus, la présence d'un glutamate à proximité du OH 2' du ribose ne permet pas la stabilisation des charges négatives du phosphate du NADP. Nous retrouvons donc ici les deux mêmes types d'antidéterminants NADP que ceux précédemment cités dans le cas des aldéhydes déshydrogénases phosphorylantes (Figure 16).

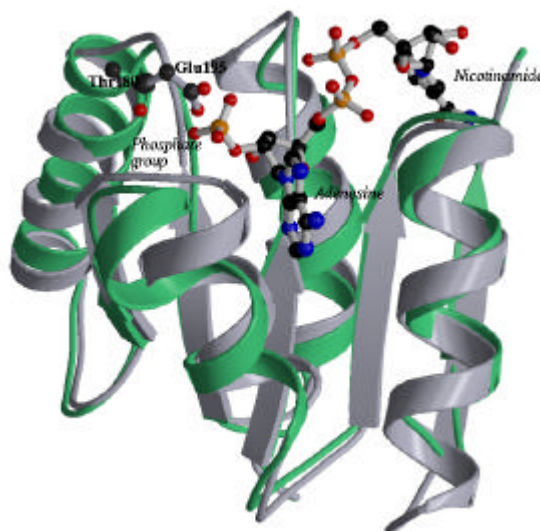


Figure 16 : Superposition des domaines de Rossmann de l'ALDH2 (NAD dépendante, gris, Glu195) et de l'ALDH de *S. mutans* (NADP dépendante, vert, Thr180). Les résidus intervenant dans la spécificité de cofacteur sont en mode sphère et bâton.

L'examen de notre structure d'ALDH de *S. mutans* complexée au NADP révèle que la Thr 180 interagit avec le groupement phosphate en 2' du ribose via le groupement hydroxyle de sa chaîne latérale et le groupement amidique de sa chaîne principale (Figure 17). Il est à noter que cette thréonine est conservée (ou remplacée par un acide aminé de même nature comme la sérine) dans toutes les séquences d'ALDH NADP dépendantes.

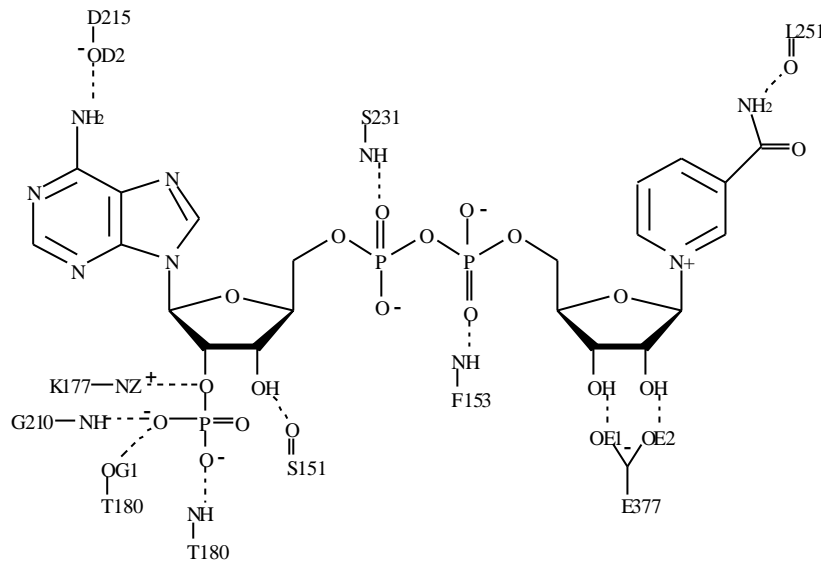


Figure 17 : Schéma représentant le réseau de liaisons hydrogène entre le NADP et la protéine dans l'ALDH de *S. mutans*

La présence d'une Thr ou d'une Ser à cette position apparaît donc être un déterminant structural pour la spécificité de cofacteur vis-à-vis du NADP.

B-1.4 Conclusion

Dans la plupart des complexes déshydrogénases/NAD examinés jusqu'alors la présence d'un résidu acide (Asp ou Glu), interagissant avec les OH en 2' et 3' du ribose adjacent à l'adénine, était observée alors qu'un résidu chargé positivement était observé dans les ALDH NADP dépendantes. Cette caractéristique a donc été considérée comme le critère déterminant pour la spécificité de cofacteur. Il ressort de notre étude, que la spécificité de cofacteur obéit en fait à un schéma plus complexe dans lequel la présence d'un résidu acide n'est pas toujours incompatible avec une bonne reconnaissance du NADP (se reporter au cas des mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus*) et où, également, la présence d'un résidu chargé positivement n'est pas toujours requise pour assurer une bonne fixation du NADP (se reporter au cas de l'ALDH NADP dépendante non phosphorylante).

B-2 Compréhension du mécanisme catalytique et des facteurs moléculaires responsables de son efficacité, caractérisation des intermédiaires réactionnels. (D. Cobessi, V. Menchise, M. Fatih, F. Favier, C. Corbier, C. Didierjean et A. Aubry)

Ce sujet s'articule autour de deux classes d'enzymes : les ALDH et les thiorédoxines

B-2.1 Introduction sur le mécanisme des ALDHs

Les Aldéhydes déshydrogénases catalysent une réaction d'oxydoréduction par un processus à deux électrons sous la forme d'un transfert d'hydrure. La réaction passe par la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal suite à la formation d'une liaison covalente entre une cystéine essentielle du site actif et le carbone aldéhydique du substrat. Selon le type d'ALDH considéré

(ALDH phosphorylante ou non phosphorylante) la deuxième partie de la réaction fait intervenir soit une molécule d'eau (ALDH non phosphorylante) pour conduire à l'acide carboxylique correspondant, soit une molécule de phosphate inorganique (ALDH phosphorylante) et le produit obtenu est alors l'acide activé (phosphorylé) (Figures 18 et 19).

Toutes ces ALDH sont actives à pH neutre, ce qui implique que l'environnement protéique doit contribuer à abaisser le pKa de la Cystéine essentielle (pKa de 9 en solution), de façon à augmenter sa nucléophilie à pH neutre (l'attaque nucléophile sur le substrat étant réalisée par la forme déprotonée de cette cystéine). De même, pour être efficace, le transfert d'hydrure doit être facilité soit par la présence d'un résidu jouant le rôle de base ; soit par la présence d'un site oxyanion permettant de diminuer suffisamment le pKa de l'hydroxyle de l'intermédiaire hémithioacétal. Enfin, une déacylation efficace par l'eau nécessite la présence d'une base permettant l'activation de la molécule d'eau alors que la réaction de phosphorylation nécessite la présence d'un site de reconnaissance anionique.

Ce projet s'inscrit dans un cadre plus vaste sur les aldéhydes déshydrogénases visant à concevoir des biocatalyseurs simples et efficaces utilisant ce type de catalyse. Ceci nécessite de comprendre l'ensemble des facteurs intervenant dans la réactivité du résidu catalytique et des différents intermédiaires, ainsi que les facteurs gouvernant une sélectivité de substrat ou de cofacteur avec l'idée de les moduler, par exemple à l'aide de la mutagenèse dirigée.

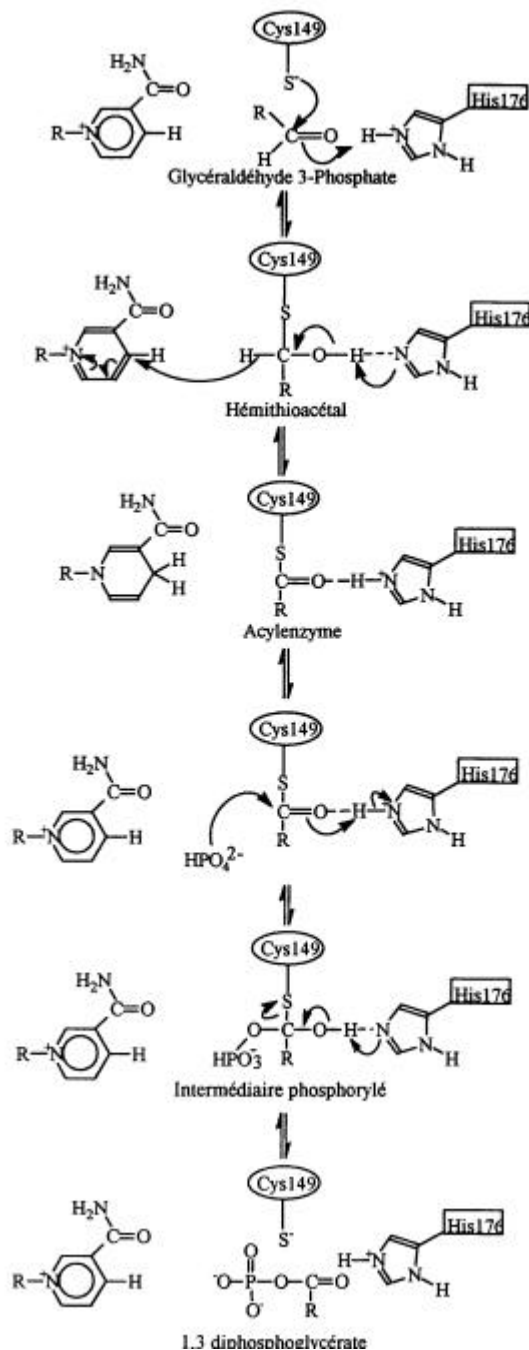


Figure 18 : Mécanisme réactionnel des ALDH phosphorylantes vu au travers de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. La réaction passe par la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal. La deuxième partie de la réaction fait intervenir une molécule de phosphate inorganique

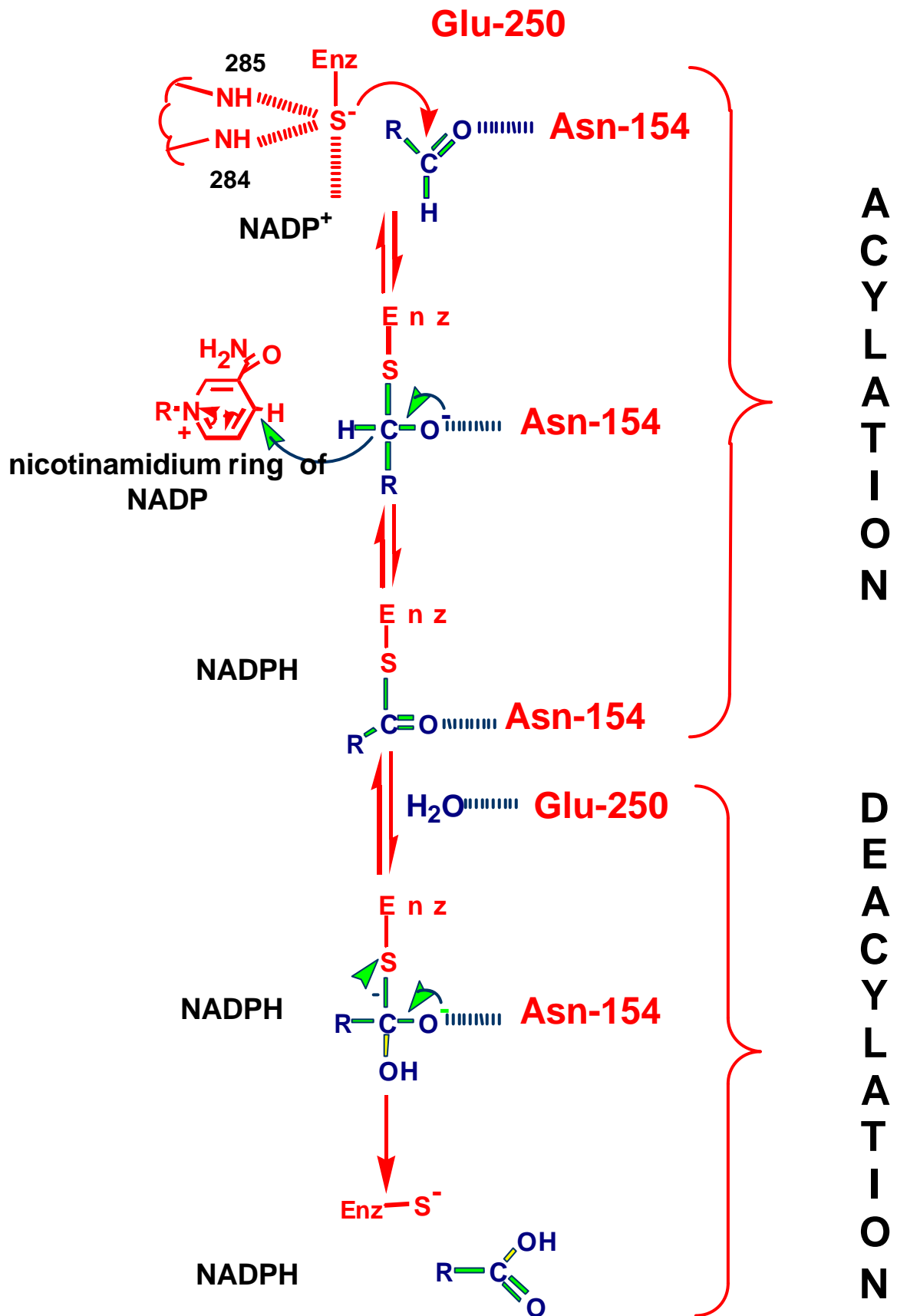


Figure 19 : Mécanisme réactionnel des ALDH non phosphorylantes vu au travers de *S. mutans* . La réaction passe par la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal. La deuxième partie de la réaction fait intervenir une molécule d'eau

B-2.2 ALDH phosphorylante : GAPDH de *B. stearothermophilus*

La Glycéraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase glycolytique est une enzyme homotétramérique de 145 kD environ qui catalyse de manière réversible la phosphorylation oxydative du D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en acide 1,3-diphosphoglycérique (1,3 dPG), en utilisant le cofacteur NAD⁺ et le phosphate inorganique (Figure 18).

Le groupement phosphate du substrat (Glycéraldéhyde-3-phosphate) et le phosphate inorganique se fixent dans des sites spécifiques de la GAPDH, dénommés Ps et Pi. Cependant, la façon dont l'enzyme reçoit et partage ses deux partenaires dans ces deux sites n'est pas totalement élucidée. La résolution de la structure d'un complexe ternaire de type GAPDH/NAD⁺/G3P nous a donc paru constituer une approche intéressante pour connaître la contribution respective de ces deux sites lors de la catalyse

Cependant un tel complexe est actif et la détermination de sa structure par diffraction X est difficilement envisageable. L'approche utilisée a donc été de produire des protéines mutées par ingénierie moléculaire, permettant l'obtention de complexes ternaires stables, dont la structure a ensuite été résolue par diffraction X

Deux protéines mutantes ont été générées : l'une inactive C149A (en mutant la cystéine essentielle à la catalyse par une alanine), l'autre faiblement active C149S (la cystéine essentielle a été substituée par une sérine qui est moins réactive)

Afin de permettre une accessibilité optimale du substrat, il a également été nécessaire de mettre au point des conditions originales de cristallisation, exemptes de tout anion, en utilisant le Polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000) comme agent précipitant. En effet, dans la plupart des structures connues, les sites Pi et Ps sont généralement occupés par des ions sulfate provenant du milieu de cristallisation. Les cristaux des deux complexes ternaires ont été préparés par trempage des cristaux des formes holo dans une solution contenant le substrat G3P de l'enzyme. Les principales informations obtenues grâce à la résolution de la structure de ces complexes sont présentées ci-dessous.

a) Complexes binaires

L'examen de la densité électronique met en évidence un large pic de densité électronique correspondant à un ion sulfate dans le site Ps alors que le site Pi est exempt de tout anion. Cet ion provient vraisemblablement de l'étape de purification par précipitation au sulfate d'ammonium. Cela implique que l'ion sulfate est resté fixé au site Ps, même après 24 heures de dialyse contre un tampon Tris-HCl. Ce résultat expérimental semble montrer que le site Ps est plus affine pour les anions sulfates que le site Pi dans les deux complexes binaires. Cette hypothèse est en accord avec celle émise par Chakrabarti (1993, *J. Mol. Biol.* 234, 463-482) et Copley et al. (1994, *J. Mol. Biol.* 242, 4, 321-329) arguant que la présence d'une arginine dans un site de fixation anionique a pour effet de renforcer l'affinité de ce site pour un sulfate ou un phosphate. En effet, l'analyse des acides aminés impliqués dans la stabilisation des sulfates dans les sites Pi et Ps de la GAPDH de type sauvage montre l'implication directe d'une arginine dans le site Ps (Arg231) qui est inexistante dans le site Pi (Skarzynski *et al.*, 1987, *J. Mol. Biol.* **193**, 171-187). De plus la contribution de la partie ribose du nicotinamide, en interaction directe avec le sulfate dans le site Ps, semble également non négligeable pour la formation d'un site de forte affinité pour les anions (Skarzynski *et al.*, 1987, *J. Mol. Biol.* **193**, 171-187).

b) Complexes ternaires

La résolution des structures des complexes ternaires a permis d'apporter des éléments de réponse concernant d'une part, la contribution des deux sites Pi et Ps au cours de la réaction, et d'autre part, la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis de l'énantiomère D du substrat.

- Contribution des sites Pi et Ps :

Deux modèles distincts avaient été proposés pour la position du phosphate du substrat dans la première étape de la réaction catalytique. Sur la base des données structurales de la GAPDH de homard, Moras *et al.* (1975, *J. Biol. Chem.* **250**, 9137-9162) avaient proposé une modélisation de l'intermédiaire hémithioacétal avec le groupement phosphate du substrat positionné dans le site Ps. Par contre, sur la base des données structurales d'un complexe ternaire GAPDH de *Bacillus stearothermophilus* / NAD⁺ / analogue de substrat (glycidol-3-phosphate), Skarzynski *et al.* (1987, *J. Mol. Biol.* **193**, 171-187) ont proposé une modélisation de l'intermédiaire hémithioacétal avec le groupement phosphate du substrat dans le site Pi. Dans les deux structures de complexes ternaires, l'analyse de la carte de densité électronique différence a révélé clairement un large pic de densité positive qui correspond sans ambiguïté au substrat *D-G3P*, le groupement phosphate en C3 du substrat se plaçant dans le site Ps.

Les résultats structuraux sur les deux complexes ternaires semblent donc en accord avec l'hypothèse de Moras *et al.* (1975, *J. Biol. Chem.* **250**, 9137-9162) puisque le substrat se fixe dans le site actif avec son groupement phosphate dans le site Ps au moins pour l'étape d'oxydo-réduction. Il est intéressant de noter que le groupement phosphate du G3P forme les mêmes interactions que l'ion sulfate situé dans le même site dans la structure de l'holoenzyme de type sauvage (Figure 20) (interactions avec les chaînes latérales des résidus Arg231 et Thr179 et avec le groupement hydroxyle O2'N du NAD⁺). **L'attaque de l'acylenzyme par la molécule de phosphate inorganique se fait donc vraisemblablement à partir du site Pi, suite à un déplacement de la boucle 208-215.**

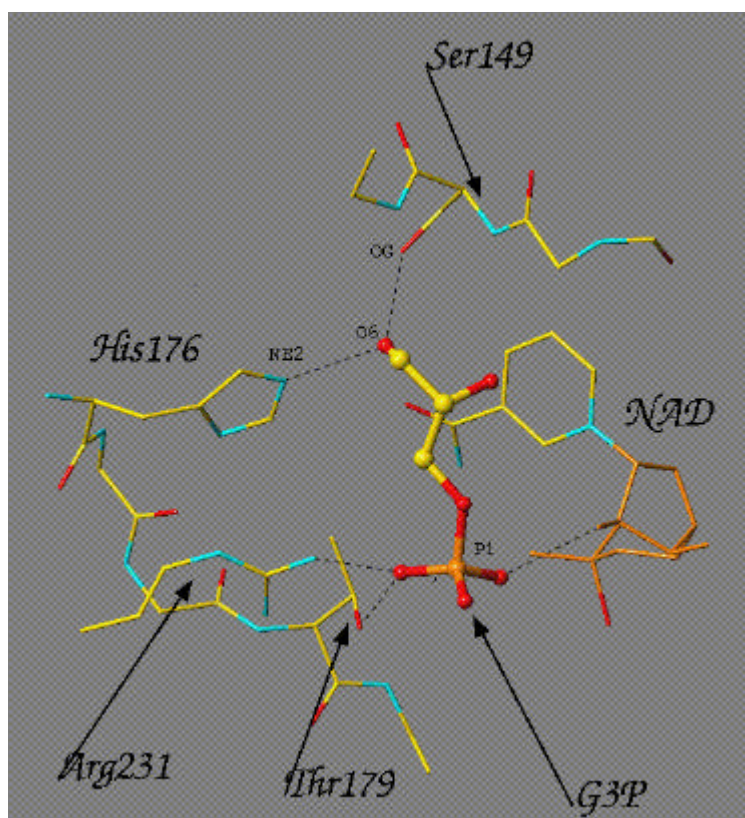


Figure 20 : Schéma représentant le site actif du complexe ternaire C149S/ NAD / G3P

-Stéréosélectivité de substrat :

Les GAPDH présentent une stéréosélectivité marquée pour l'énantiomère D du Glyceraldéhyde-3-phosphate, qui a, elle aussi, fait l'objet de controverses dans la littérature. Par modélisation de l'intermédiaire hémithioacétal dans le site actif de l'enzyme de homard, Moras *et al.* (1975, *J. Biol. Chem.* **250**, 9137-9162) avaient proposé que la stéréosélectivité soit due à une interaction entre le groupe hydroxyl en C₂ du substrat et la chaîne latérale de Ser 148. Cette hypothèse avait été ensuite réfutée par Skarzynski *et al.*, (1987, *J. Mol. Biol.* **193**, 171-187) qui à partir de la structure à haute résolution de l'enzyme de *B. stearothermophilus*, observait pour la chaîne latérale de la serine148 une orientation différente celle trouvée par Moras *et al.* (1975, *J. Biol. Chem.* **250**, 9137-9162). En effet, dans la structure de l'enzyme de *B. stearothermophilus*, une liaison hydrogène est présente entre le groupe OH de le Ser148 et le groupement amidique de Thr 151, semblant exclure l'implication de ce résidu Ser dans la stéréosélectivité. Par ailleurs, Duée *et al.* (1996, *J. Mol. Biol.* **257**, 814-838), ont modélisé l'intermédiaire hémithioacétal dans la GAPDH de *E. coli* et proposé l'existence d'une interaction forte entre l'oxygène O5 du groupe hydroxyle en C2 de l'intermédiaire hémithioacétal modélisé et le groupe NH de Cys 149 qui expliquerait cette stéréosélectivité (Figure 20).

Les deux structures des complexes ternaires montrent la présence de l'isomère D dans le site actif, indiquant que les mutants C149A et C149S sont strictement stéréosélectifs. Ainsi, le groupement thiol de Cys149, résidu essentiel de la catalyse, n'est pas impliqué dans ce phénomène de stéréosélectivité. Par ailleurs, dans ces complexes, la chaîne latérale de la Ser148 forme une liaison hydrogène avec le groupement amidique de Thr 151, ce qui exclut définitivement toute contribution de ce résidu à la sélectivité de substrat. Enfin, les distances entre l'oxygène du groupe hydroxyle en C₂ du G3P et le groupement amidique du résidu 149, bien qu'un peu longues (de l'ordre de 3.5 Å dans les deux complexes), laissent supposer une interaction faible mais effective entre ces groupements. Ce groupe hydroxyle est également en interaction avec une molécule d'eau présente dans les quatre monomères des deux structures. **Nos résultats structuraux confortent donc l'hypothèse de Duée et al. (1996, *J. Mol. Biol.* **257**, 814-838) et apportent une réponse définitive quant à la nature des facteurs structuraux responsables de la stéréosélectivité de substrat.**

B-2.3 ALDH non phosphorylantes

Bien qu'appartenant à une famille structurale distincte de celle des ALDH phosphorylantes, les ALDH non phosphorylantes catalysent une réaction globalement similaire, faisant intervenir l'attaque nucléophile d'une cystéine essentielle sur le carbone aldéhydique du substrat et un transfert d'hydrure. Seule l'étape de déacylation diffère puisque que l'oxydation irréversible de la forme aldéhydique du substrat en acide carboxylique nécessite l'intervention d'une molécule d'eau chez les ALDH NADP-dépendantes non phosphorylantes alors que la déacylation par une molécule de phosphate inorganique conduit à l'acide activé dans le cas de des ALDH phopshorylantes (Figure 19).

La résolution des structures d'ALDH non phosphorylante de *S. mutans*, sous forme apo, holo (en présence de NADP) ainsi que d'un complexe ternaire enzyme mutée/cofacteur/substrat ont permis non seulement d'identifier les éléments clefs du mécanisme catalytique, mais aussi de préciser leurs rôles lors des différentes étapes de la réaction

a) *La réactivité de la Cystéine essentielle résulte d'un changement d'orientation consécutif à la fixation du cofacteur*

La comparaison des structures apo et holo (en présence de NADP) de l'ALDH de *S. mutans* révèle que l'orientation de la cystéine est différente, selon que le cofacteur est présent ou non. Ainsi, ce changement d'orientation la positionne dans un environnement protéique différent et nous pensons comme Steinmetz *et al.* (1997, *Structure*, **5**, 701-711) que ce changement d'orientation est responsable de la diminution de son pKa, qui passe de 8,5 dans l'apoenzyme à 6,1 dans la forme holoenzyme. Ceci explique que la cystéine soit sous forme active (déprotonée) au pH physiologique. Dans notre cas, la diminution du pKa de la cystéine ne ferait donc pas intervenir la présence d'un résidu basique, comme c'est le cas dans les ALDH phosphorylantes où un résidu His contribue fortement à une diminution de pKa de la cys essentielle via la formation d'une paire d'ions. Cette hypothèse est confirmée par l'étude d'un mutant dans lequel le glutamate conservé en position 250 a été remplacé par une alanine (une des hypothèses de travail étant que le résidu Glu250 puisse contribuer à activer la Cys essentielle en jouant un rôle de base via une molécule d'eau). Dans ce mutant, une variation de pKa de 8,5 à 6,1 est également observée lors de la fixation du cofacteur (Marchal *et al.*, 1999, *Biochemistry*, *in press*). Ainsi, par les résultats couplés de la cristallographie et de l'enzymologie il est possible d'affirmer que le glutamate ne participe pas à la première étape de la réaction catalytique et donc, qu'aucune molécule d'eau n'est nécessaire à l'activation de la cystéine; la baisse de son pKa résultant en grande partie (2 unités) de la réorientation de sa chaîne latérale à proximité des groupements NH de la chaîne principale et dans une moindre mesure de la charge positive du cycle du nicotinamide (0,5 unité). Ainsi, au pH physiologique, la forme thiolate peut exister et la réaction peut se produire.

b) *L'étape de transfert d'hydrure n'est pas assistée par l'intervention d'une base, mais par la présence d'un site oxyanion*

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'efficacité de transfert d'hydrure est conditionnée soit par la présence d'un résidu jouant le rôle de base, soit par la présence d'un site oxyanion assurant une diminution suffisante du pKa de l'intermédiaire thiohémiacétal. Dans le cas des ALDH phosphorylantes, le transfert d'hydrure est assisté par la présence d'un résidu His qui joue le rôle de base. Dans le cas de l'ALDH non phosphorylante de *S. mutans*, la situation est très différente : l'analyse de la structure de l'apoenzyme montre l'interaction d'un de ses ions sulfate avec le NH Cys284 et la fonction amine de Asn154, résidu très conservé chez les ALDHs et qui pourrait participer à la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique (site oxyanion) (Figure 21). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris la détermination de la structure d'un complexe ternaire, ALDH/NADP/substrat. Dans ce complexe ternaire, l'Asn154 interagit avec l'oxygène du carbone 1 du substrat au même titre que le groupement NH de Ser284. Ces constatations confirment le rôle supposé de l'asparagine et ont été confirmées par mutagenèse dirigée.

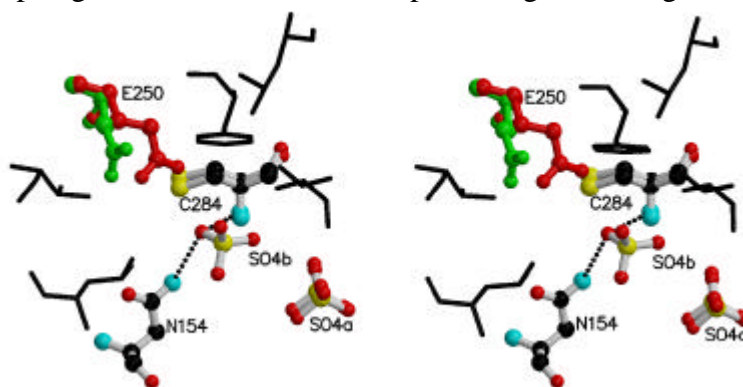


Figure 21 : Vue stéréoscopique de la superposition des sites catalytiques de deux formes d'apo enzyme montrant la rotation de Glu250 lors de la fixation d'un second ion sulfate dans le site catalytique. Les résidus de l'environnement hydrophobe sont coloriés en noir.

c) *L'étape de déacylation implique l'activation d'une molécule d'eau via un résidu glutamate essentiel*

L'oxydation irréversible de la forme aldéhydique du substrat en son produit de forme acide nécessite l'intervention d'une molécule d'eau chez les ALDH NADP-dépendantes non phosphorylantes contrairement aux ALDH NAD(P)-dépendantes phosphorylantes où l'oxydation réversible du G3P fait intervenir un phosphate inorganique. Pour que la déacylation soit efficace, la molécule d'eau doit être activée ou/et positionnée par un résidu jouant le rôle de base, la forme OH étant plus réactive qu'H₂O. Chez les ALDHs, la molécule d'eau serait activée par un résidu Glutamate (Glu 250), situé à environ 7 Å de la cystéine essentielle. Ce résidu est quasiment conservé dans toutes les séquences et pourrait d'une part contribuer au bon positionnement de la molécule d'eau, et d'autre part, activer (déprotoner) cette molécule d'eau pour faciliter son attaque sur l'intermédiaire thioacylenzyme. Cette molécule d'eau n'étant pas observable dans nos structures, nous envisageons de déterminer la structure d'un complexe holoenzyme (mutée E250Q)/hydroxylamine. L'hydroxylamine est un nucléophile qui joue un rôle compétiteur par rapport à l'eau. Nous espérons visualiser sur ce complexe le positionnement de l'hydroxylamine, et en déduire celui de la molécule d'eau. Cette étude nous permettrait de confirmer définitivement le rôle du glutamate et de préciser la géométrie d'attaque de la molécule d'eau lors de l'étape de déacylation.

d) *Conclusion*

Les études que nous avons menées portent sur deux types de déshydrogénases (phosphorylantes ou non). Ces deux types d'enzymes catalysent une réaction très similaire impliquant dans les deux cas, un processus d'oxydoréduction faisant intervenir un résidu Cys comme nucléophile, un transfert d'hydrure sur le NAD(P) et un substrat identique. **Il ressort de cette étude que, si la nature de la réaction catalysée est la même, les motifs structuraux, les acides aminés impliqués et les facteurs qui gouvernent l'efficacité de la réaction sont très différents.** Ceci peut être interprété comme **le résultat de schémas d'évolution différents** qui ont convergé vers une même fonction.

B-2.4 les thiorédoxines

Ce projet concerne l'étude structurale et la compréhension du mécanisme catalytique des thiorédoxines et protéines apparentées.

Les thiorédoxines sont de petites protéines ubiquitaires possédant un pont disulfure très réactif qui présente la séquence conservée C-G(A/P)-P-C. Bien que les thiorédoxines soient structurellement connues, leur mécanisme catalytique n'est pas totalement élucidé. L'activité spécifique est basée sur les deux cystéines (en position 36 et 39) du site actif qui subissent une oxydation pour conduire à un pont disulfure tandis que la protéine cible est réduite de façon concomitante (Figure 22). Un aspartate (D30 dans la séquence de thiorédoxine de *C. reinhardtii*), enfoui à l'intérieur hydrophobe de la protéine pourrait être impliqué dans une catalyse acide-base générale (LeMaster *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**, 29998-30001), facilitant la cassure de l'intermédiaire disulfure mixte (intermédiaire réactionnel possédant un pont disulfure entre la Cystéine.36 de la thiorédoxine et une cystéine de la protéine cible). En d'autres termes, le rôle de cet aspartate pourrait être d'arracher un proton à la Cystéine 39 de façon à l'activer (passage sous forme thiolate, déprotonnée) pour la deuxième étape de la réaction.

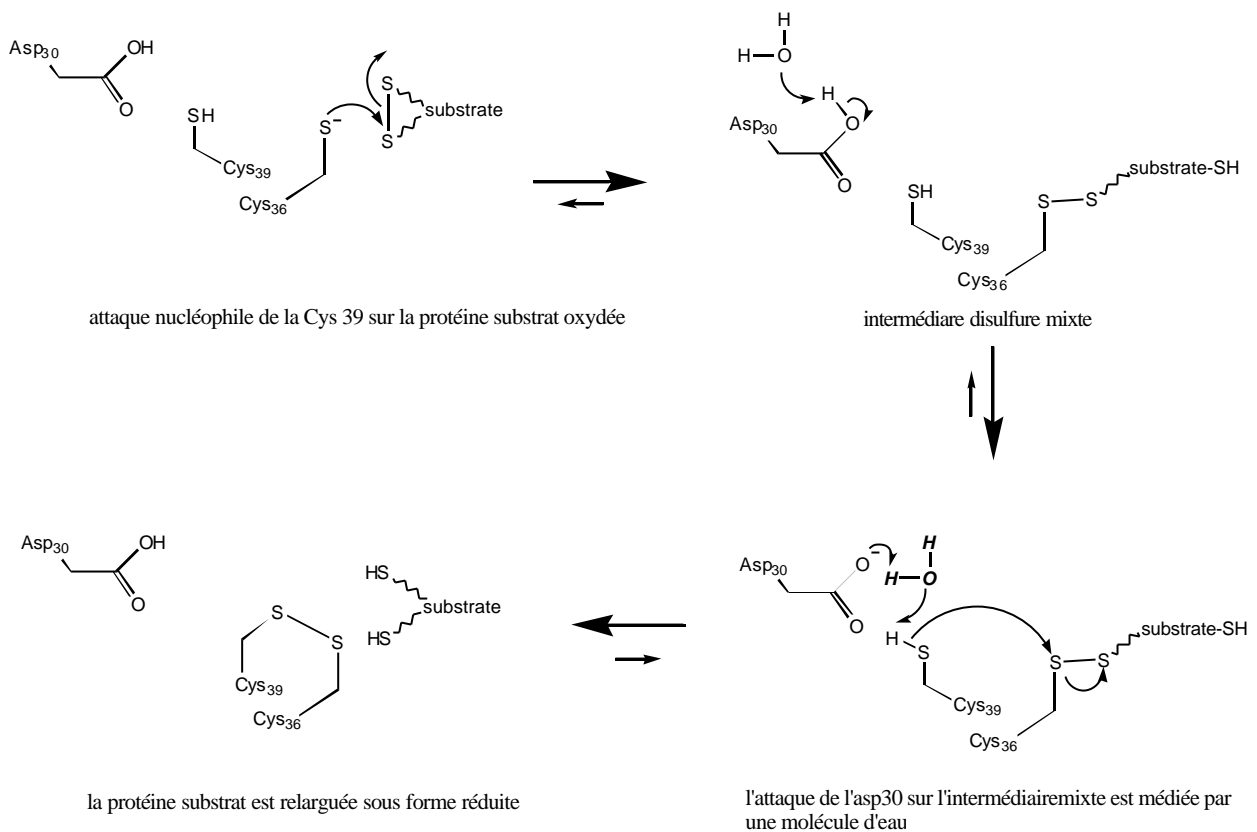


Figure 22 : schéma du mécanisme catalytique proposé pour les thiorédoxines.

Afin de mieux comprendre le rôle de ce résidu dans la catalyse, nous avons déterminé la structure de la thiorédoxine sauvage de *C. reinhardtii* ainsi que d'une protéine mutée dont le résidu aspartate essentiel a été remplacé par une alanine. L'examen des structures montre que la mutation ne cause aucune distorsion du site actif et valide donc les résultats biochimiques obtenus sur le mutant (figure 23). Il révèle également que la distance entre les deux résidus (6?) est trop grande pour expliquer une intervention directe du résidu aspartate.

Deux hypothèses étaient alors envisageables :

- l'existence d'un changement de conformation lors de la catalyse qui permettrait un rapprochement suffisant des deux résidus,
- l'intervention d'une molécule d'eau qui pourrait servir de relais entre l'aspartate et la cystéine.

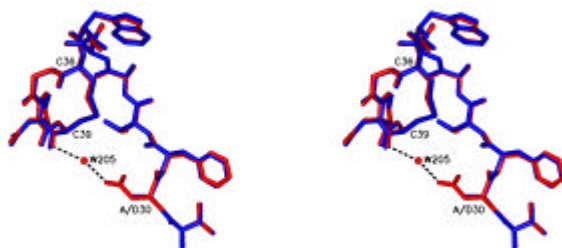


Figure 23 : Superposition de la structure de la thiorédoxine sauvage (rouge) avec la protéine mutée Asp30Ala (bleu).

Dans le but de conforter l'une ou l'autre de ces hypothèses et de mieux comprendre le rôle du résidu Asp30, nous avons entrepris des études de dynamique moléculaire, *in vacuo*, et aussi en relation avec l'accessibilité au solvant. La dynamique réalisée *in vacuo* nous amène à conclure que la mobilité relative des deux résidus Cys39 et Asp30 n'est pas suffisante pour envisager un transfert direct de proton entre les deux résidus; en effet, la distance observée reste toujours supérieure à 6 Å tout au long de la dynamique. D'un point de vue structural, ceci peut s'expliquer par le fait que l'aspartate est placé au centre d'un feuillet β qui constitue le cœur de la molécule et la Cys se situe à l'extrémité d'une hélice. Tout rapprochement des deux résidus nécessiterait un mouvement de translation de l'hélice en direction du feuillet. Or ce mouvement est rendu impossible par la présence de résidus hydrophobes et encombrants, appartenant soit à l'hélice soit au feuillet, qui forment un cœur hydrophobe et sont conservés dans l'ensemble des thioredoxines. La dynamique réalisée dans l'eau montre qu'une molécule d'eau vient se positionner à une distance compatible avec la formation d'une liaison hydrogène à la fois avec l'atome de soufre de la Cys39 et l'oxygène OD1 du groupement carboxylate de l'aspartate, pontant ainsi les deux résidus (distances moyennes Ow-Cys39SG 3.8 Å et Ow-Asp30OD1 3.1 Å).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de **conclure que le rôle de base joué par l'Asp30 envers la Cys39 au niveau de l'intermédiaire mixte était très vraisemblablement médié par une molécule d'eau et nous a conduit à proposer un nouveau mécanisme** présenté figure 22.

C- Interactions intermoléculaires

C-1 Interactions pseudopeptides-substrats

L'étude de la structure et des conformations des peptides biologiquement actifs est d'un grand intérêt au vu du potentiel pharmacologique de ces matériaux qui, de plus, possèdent une toxicité restreinte par rapport à d'autres classes de drogues. Durant ces dernières années un grand nombre de peptides biologiquement actifs a été caractérisé couvrant un large domaine de fonctions biologiques. En fait, ces molécules sont des hormones, vaccins, inhibiteurs d'enzymes et de protéines, édulcorants, opioïdes, antibiotiques, facteurs de relaxation et régulateurs de fonctions de nombreuses autres molécules biologiquement actives, cytoprotecteurs, immunosuppresseurs ou immunostimulateurs...

Il est bien connu que la fonction biologique des peptides biologiquement actifs est fortement dépendante de leurs structures chimiques ainsi que de la conformation adoptée au niveau du récepteur. La grande flexibilité des chaînes peptidiques conduit à l'existence simultanée d'un grand nombre de conformères. Seul l'un d'entre eux possède la conformation adéquate pour exercer la fonction biologique, ce qui montre la difficulté d'une description complète des relations structure-activité. Ainsi, de toute évidence, la compréhension des relations structure-activité est d'une importance considérable dans la création de nouveaux matériaux plus sélectifs et plus efficaces d'un point de vue pharmacologique. De même, l'introduction de modifications chimiques adéquates dans les chaînes polypeptidiques devraient conduire ces nouvelles molécules pseudopeptidiques à adopter des conformations mieux définies et donc plus susceptibles de se fixer aux récepteurs si les conformations sont bien choisies.

Nous entendons par analogue pseudopeptidique le remplacement d'un ou de plusieurs motifs C^α -CO-NH- C^α d'une chaîne peptidique par des groupements de nature non peptidique. Cette modification est un moyen d'agir sur plusieurs facteurs :

- réduire la biodégradation des espèces et donc augmenter leurs durées de vie *in vivo* ;

- perturber le réseau de liaisons hydrogène inter ou intramoléculaires, et par là-même modifier les propriétés conformationnelles des molécules en favorisant ou interdisant certaines conformations locales ;
- modifier la balance hydrophilie/hydrophobie ;
- modifier la distribution électronique...

Un avantage de cette approche, par rapport aux analogues peptidiques, est que l'on peut **moduler les tendances conformationnelles** des analogues pseudopeptidiques indépendamment de la nature des substituants latéraux. Cette approche se heurte cependant à deux difficultés majeures :

- la difficulté d'introduire des groupements non peptidiques dans une chaîne peptidique ;
- la méconnaissance des conséquences structurales de l'introduction de groupes non peptidiques.

Jusqu'à aujourd'hui notre travail a essentiellement consisté à mettre au point **des modifications conduisant à des conformations bien particulières** qui seront utilisées dans la synthèse de molécules superactives comme nous le montrerons plus loin dans la présentation de la partie "interactions pseudopeptides-ligands".

Pour des raisons de place ne seront cités que quelques exemples de ces modifications et le lecteur intéressé pourra se reporter aux publications se rapportant à ce sujet pour d'autres pseudopeptides

C-1.1 Quelques caractéristiques conformationnelles des pseudopeptides (C. Didierjean, C. Corbier, V. Menchise et A. Aubry, collaborations UMR ENSIC (M. Marraud), ENS Lyon (J. Vidal & A. Collet), IBMC Strasbourg (J.P. Briand)), (publications A96-1, A98-1 et 2, O96-1, P96-5, 7, 20 et 26, P97-6, 25 à 29, P98-22, 24, 25, 27, P99-4 et 6, P00-4 et 7)

a) Azapeptides

Cette modification de la chaîne polypeptidique consiste en la substitution du carbone α par un atome d'azote. Cette modification, somme toute mineure, met cependant en évidence un comportement conformationnel tout à fait particulier.

Du point de vue conformationnel, l'aza-proline se comporte comme une "anti-proline" car, contrairement à la proline, elle favorise le repliement de la séquence qui la précède. De plus, elle favorise la forme *cis* du lien amide qui la précède, de telle sorte que le repliement formé est du type β VI (Fig. 24). De plus, contrairement à un résidu amino acide classique, l'aza-analogue s'avère être un fort inducteur du repliement β , même lorsqu'il est suivi par une proline (Fig. 24).

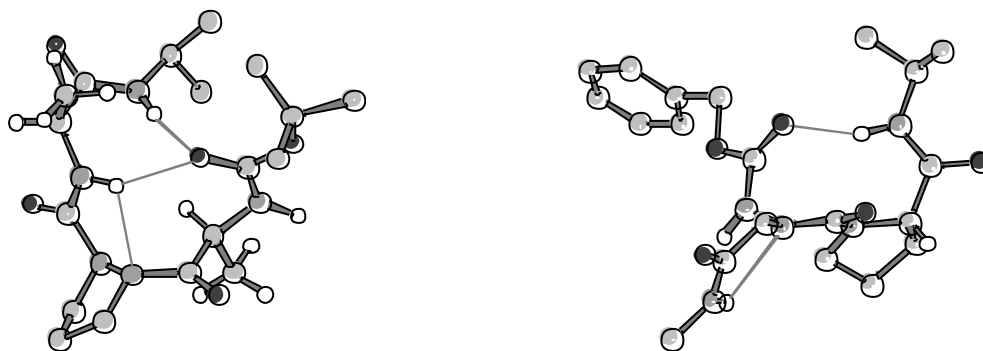


Fig.24 : Structure de l'aza-tripeptide Boc-Ala-AzPro-Ala-NHiPr à l'état solide montrant le repliement β VI de la séquence Ala-AzPro (gauche) et structure de l'aza-dipeptide Z-AzAsn(Me)-Pro-NHiPr à l'état solide montrant le repliement β I de la séquence AzAsn-Pro.

b) Peptides réduits

Cette modification de la chaîne polypeptidique consiste en la substitution du groupe carbonyle C=O par un groupement CH₂.

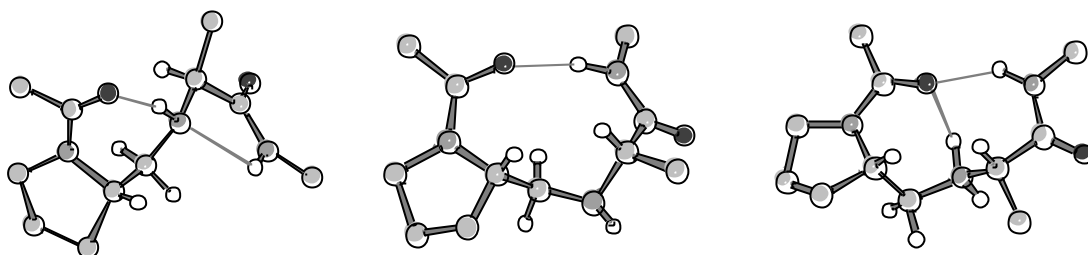


Fig. 25 : Structures adoptées par le peptide réduit Piv-Proy[CH₂-NH]Ala-NHiPr dans l'état neutre en solution (gauche), neutre à l'état solide (milieu) et protoné en solution (droite).

Nous avons examiné l'influence structurale de la réduction du carbonyle amide en méthylène, et cela dans les deux états amine et ammonium susceptibles d'exister dans les conditions physiologiques. Le lien amide réduit induit une flexibilité conformationnelle illustrée dans la figure 25. Cette flexibilité disparaît totalement par protonation car le groupe ammonium est un très fort donneur de proton qui stabilise des formes repliées.

c) Peptides vinyliques

Le carboxyle est séparé du carbone α par un groupe éthylénique -CH=CR- *cis* ou *trans*. Les analogues *cis* et *trans* vinylique de la proline ont été introduits dans des peptides en vue de déterminer l'influence conformationnelle de ce motif sur une chaîne peptidique. L'isomère *trans* conduit à une structure ouverte, et l'isomère *cis* à une structure repliée sous l'influence d'une liaison hydrogène qui ferme un cycle à 9 atomes (Fig. 26).

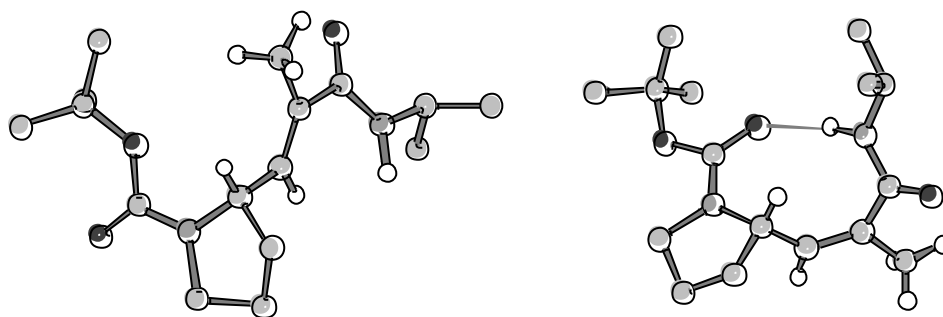


Fig. 26 : Structure ouverte ou repliée du peptide vinylique Boc-Proy[CH=CMe-CO-NH]NHiPr à l'état solide selon la forme *trans* (gauche) ou *cis* (droite) du motif vinylique.

d) Peptides C ^{α} disubstitués : Ac-(Aib)₂-Lys(Bzl)-(Aib)₂-Lys(Bzl)-(Aib)₂-NHMe

Les modifications apportées ici concernent les carbones α qui ne portent plus d'atome d'hydrogène comme dans un peptide classique. Ces modifications conduisent généralement à des structures en hélices régulières. Les structures sont souvent constituées par plusieurs molécules par unité asymétrique ce qui conduit à résoudre des structures de mésomolécules.

Les données de cet octapeptide ont été enregistrées à basse température (100K) de façon à limiter au maximum les effets néfastes de l'agitation thermique au niveau de la précision des distances et angles et de la résolution.

La structure a été résolue à l'aide du programme Patterson search au moyen d'une structure présentant une conformation voisine. La molécule s'enroule en une hélice 3_{10} quasi-parfaite et les deux chaînes latérales volumineuses sont situées sur la même génératrice de l'hélice. Les hélices s'associent tête-queue formant ainsi une pseudo hélice infinie (Figure 27).

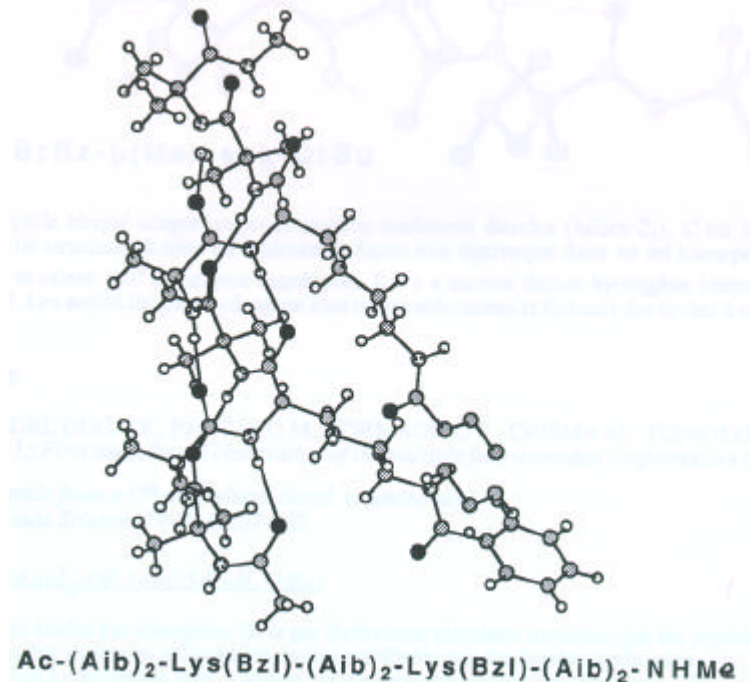


Figure 27 : Hélice 3_{10} de l'octapeptide Ac-(Aib)₂-Lys(Bzl)-(Aib)₂-Lys(Bzl)-(Aib)₂-NHMe

Cette structure a été utilisée par l'équipe de C. Lecomte comme modèle simplifié des hélices protéiques dans le cadre de la complémentarité des composantes du laboratoire. Une publication commune est parue.

Examinons maintenant deux cas où vont être introduits ces motifs pseudopeptidiques.

C-1.2 Caractérisation des conformations adoptées par des mimes peptidiques en interaction avec le paratope d'anticorps neutralisant le virus de la fièvre aphteuse: implications vaccinales et thérapeutiques (D. Cobessi, V. Menchise, G. Mulliert, C. Corbier et A. Aubry)

Ce thème de recherche a été retenu par le programme PCV. J'en suis le coordinateur. Il est l'un des thèmes prioritaires du groupe. C'est une collaboration avec S. Muller et J.P. Briand de L'IBMC de Strasbourg (UPR 9021) et M.T. Cung (URA 494). Il a déjà fait l'objet d'intenses recherches dans notre groupe au niveau de la cristallisation des complexes. Les échecs sont dus à un manque important de pureté. Nos collègues ont fait de très gros efforts dans ce sens et nous allons repartir sur des bases beaucoup plus saines ce printemps. Pour ce faire, le groupe strasbourgeois a purifié une quantité importante de l'ordre de 200mg de l'anticorps monoclonal 4x11 anti-IRGERA (IRGERA est le déterminant antigénique majeur de l'histone H3). La production et la purification poussée de fragments Fab'₂ est actuellement en cours chez eux. Suivront ensuite des études cinétiques de mesure d'affinité en BIAcore de ces fragments vis à vis de divers analogues IRGERA. Le groupe a aussi effectué le séquençage des régions variables V des chaînes lourdes et légères de cet anticorps. Enfin des quantités importantes du peptide parent (GG)¹³⁰IRGERA¹³⁵ ainsi que des

peptides de plus en plus longs ont été synthétisées en phase solide afin d'étudier les meilleurs candidats pour la cristallisation

En immunologie, l'utilisation de peptides correspondant par exemple à des épitopes viraux, bactériens ou tumoraux, pour induire des réactions de défense est une stratégie prometteuse dans le développement de vaccins synthétiques. Des peptides synthétiques entrent également dans l'élaboration de kits de diagnostic en tant que sondes pour la détection d'anticorps chez des patients, par exemple des patients autoimmuns ou des individus infectés par le virus HIV. Cependant la faible résistance de ces peptides à la protéolyse dans les fluides biologiques et leur mauvaise diffusion à travers les systèmes membranaires sont d'importants facteurs limitants. Il est probable qu'une meilleure résistance des peptides aux protéases améliore significativement leur propriétés antigéniques et immunogéniques ainsi que leurs effets thérapeutiques potentiels.

Pour remédier à ces problèmes et développer des analogues plus actifs, plus spécifiques et plus stables, de nombreuses approches ont été proposées faisant appel à des modifications de la nature chimique du squelette ou de la liaison peptidique. Cependant toute modification de la liaison peptidique, qui la rend moins sensible à la biodégradation, ne doit pas perturber profondément la conformation du peptide afin qu'il ne perde pas sa capacité à mimer la région antigénique de la protéine parente. L'introduction de la modification rétro-inverso (RI) semble être une approche des plus prometteuses. Un analogue entièrement rétro-inverso d'un peptide naturel est obtenu en inversant à la fois la chiralité de chaque carbone $C^{\alpha}H$ et l'orientation de la chaîne peptidique. D'autre part, les extrémités N- et C-terminales sont modifiées en remplaçant le premier acide aminé par un dérivé malonique et en ajoutant une amine en position C-terminale. On admet que sous l'influence de cette modification, l'orientation spatiale des chaînes latérales actives est conservée par rapport à celle du peptide parent. Dans plusieurs exemples, il a été observé que des anticorps monoclonaux induits contre le peptide naturel se lient aux analogues RI avec une constante d'affinité à l'équilibre nettement supérieure à celle mesurée pour le peptide parent (jusqu'à 500 fois, ou plus). De plus, ces analogues sont immunogènes et présentent des temps de demi-vies, en présence d'enzymes protéolytiques, augmentés jusqu'à 100 fois.

Au cours de notre étude, nous allons particulièrement nous intéresser à l'étude conformationnelle de deux séquences antigéniques, le peptide IRGERA, représentant un épitope majeur de l'histone H3 (figure 28), et la séquence 141-159 du site antigénique majeur de la boucle G-H de la protéine virale VP1 de la capsid du virus de la fièvre aphteuse (FMDV), et de leurs analogues RI (figure 29). Le peptide IRGERA, représentant l'épitope majeur de l'histone H3, est un bon modèle pour l'étude des relations structure-activité d'analogues pseudo-peptidiques. Il a en effet été observé que le simple remplacement du résidu C-terminal L-Ala par un résidu D-Ala suffit pour abolir la reconnaissance du peptide résultant par les anticorps induits contre le peptide parent. De plus, les anticorps anti-peptide parent reconnaissent le peptide RI avec une affinité de 75 à 270 fois supérieure à celle mesurée pour le peptide parent et proche de celle de la protéine entière, l'histone H3

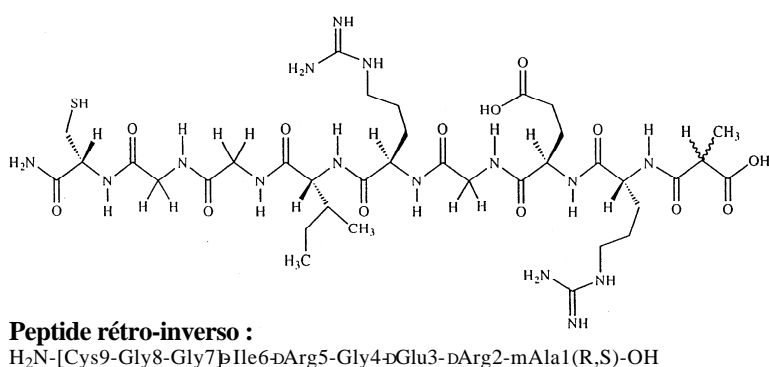
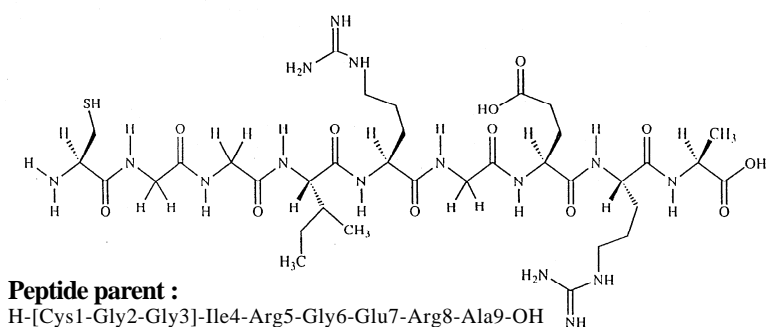


Figure 28 : Représentation schématique du peptide L parent (CGG)¹³⁰IRGERA¹³⁵ et de son analogue rétro-inverso mADRDEGDRDI(GGC). m, malonate.

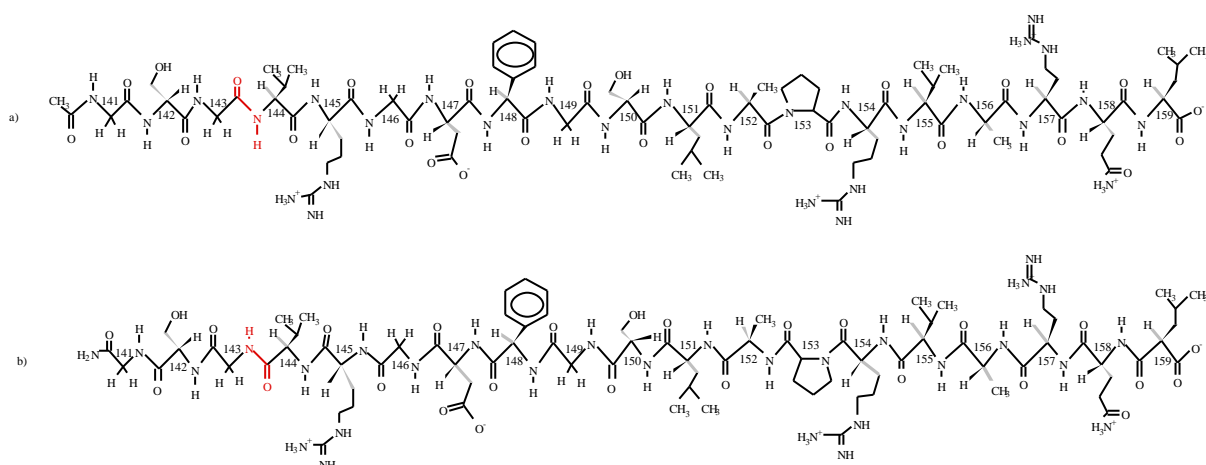


Figure 29 : Représentation schématique de la séquence ¹⁴¹GSGVRGDFGSLAPRVARQL¹⁵⁹, peptide L parent (a) et de la séquence rétro-inverso correspondante (b). Le peptide rétro-inverso a été synthétisé avec des résidus de configuration D et sa séquence est inversée par rapport à celle du peptide parent. La même numérotation des résidus est conservée dans les deux séquences.

L'apport de la cristallographie à de telles études est fondamentale car elle peut conduire, après examen attentif des zones d'interaction moléculaire et utilisation de la modélisation moléculaire, à proposer de nouveaux effecteurs encore plus puissants que ceux proposés un peu au hasard au départ de tels travaux. La connaissance du comportement conformationnel de nombreux pseudo-peptides est un atout important dans le choix de ces effecteurs et donc dans la réussite de tels projets.

C-1.3 Caractérisation des conformations adoptées par des mimes peptidiques en interaction avec l'élastase. (D. Cobessi, G. Mulliert, C. Corbier et A. Aubry, collaborations ENS de Lyon (A. Collet et J. Vidal), UMR de l'ENSIC (M. Marraud) et institut J. Monod de Paris (M. Reboud))

Ici également ce sujet est plus au stade de projet ou de prospective. Quelques essais fructueux de cristallisation ont été effectués sur l'élastase (PPE) (dont la structure RX est connue) et nous tentons actuellement de faire diffuser le pseudopeptide dans le cristal. L'élastase leucocytaire humaine (HLE) est une enzyme impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'emphysème pulmonaire, la bronchite chronique, l'arthrite rhumatoïde ou encore le psoriasis. C'est une enzyme qui fait partie de la grande classe des protéases qui hydrolysent de façon irréversible les fonctions amide -CO-NH- des liaisons peptidiques dans les protéines. Ces protéases sont contrôlées par des inhibiteurs spécifiques qui régulent leur activité et donc évitent des dégradations excessives des protéines. Parfois, les protéines sont exagérément dégradées car les protéases sont trop actives en raison d'un manque ou d'une déficience d'inhibiteur. Ainsi, par exemple, dans l'emphysème pulmonaire le gène codant l'inhibiteur principal de l'élastase, l'alpha-P1, est parfois muté. La concentration plasmatique de cet inhibiteur diminue de sorte que l'élastase est trop active et dégrade l'élastine présente dans les parois des alvéoles pulmonaires.

Il est donc important de mettre au point des inhibiteurs spécifiques efficaces et qui résistent au mieux à la biodégradation par les peptidases avant d'atteindre leurs cibles.

L'élastase est une petite enzyme de 230 résidus amino acides dont la structure est parfaitement connue. Le but de ce travail est d'utiliser nos connaissances sur les pseudopeptides et plus spécifiquement sur les hydrazinopeptides pour mettre au point de nouveaux inhibiteurs. En fait certaines molécules ont déjà été testées avec succès *in vitro* mais la connaissance précise des interactions enzyme-inhibiteur permettra de proposer des inhibiteurs encore plus puissants en combinant les résultats de la cristallographie et de la modélisation moléculaire. Ce sujet est également excellent pour des études de densité de charge et de modélisation par les méthodes développées par les autres composantes du laboratoire.

C-2 Interactions protéine-protéine. (F. Favier, C. Corbier, D. Cobessi, V. Menchise, C. Didierjean et A. Aubry, collaborations FR Protéine et Biologie Forestière)

De nombreuses espèces oxydantes actives sont naturellement produites dans les systèmes biologiques. Leur grande réactivité cause des dommages cellulaires qui augmentent avec l'âge. En particulier, les résidus peptidiques de type méthionine sont très sensibles au stress oxydatif, puisqu'ils forment facilement des méthionine-sulfoxydes. Si certaines méthionines de surface sont oxydées avec peu de dégradation des propriétés protéiques, beaucoup de cas attestent d'un effet drastique de l'oxydation des méthionines sur les protéines. Les structures secondaires et tertiaires sont souvent altérées, et l'activité enzymatique peut être perdue. Pour résoudre le risque de disfonctionnement causé par de tels agents oxydants, la plupart des organismes, si ce n'est tous, possèdent un enzyme appelé Peptide Méthionine Sulfoxyde Réductase (PMSR, EC 1.8.4.6) qui réduit les méthionine-sulfoxydes peptidiques en méthionines et restore les fonctions protéiques. Elle a été identifiée pour la première fois dans *E. coli*. Mais il reste difficile de lui attribuer un rôle précis. La PMSR serait un antioxydant *in vivo* puisqu'elle confère à la cellule une résistance au stress oxydatif. Mais la PMSR peut aussi agir comme régulateur de processus impliquant l'oxydation des méthionines.

L'activité enzymatique de la PMSR n'est révélée qu'en présence d'un réducteur, qui *in vivo* est vraisemblablement la thiorédoxine sur laquelle nous travaillons dans le cadre d'un autre projet

(voir partie II). Il nous a donc semblé judicieux d'utiliser ces connaissances et d'entreprendre la cristallisation et l'étude de ce complexe protéique qui possède un rôle biologique très important. Avant cela nous avons entrepris la détermination de la structure de la PMSR (211 acides aminés) pour laquelle rien n'est connu sur la structure tridimensionnelle ni sur la spécificité structurale. La famille des PMSRs ne présente aucune similarité avec d'autres protéines et est éloignée de toute protéine de structure tridimensionnelle connue qui pourrait permettre une résolution du problème des phases par les méthodes du remplacement moléculaire. L'utilisation d'une enzyme dans laquelle ont été incorporées des sélénométhionines permettra de résoudre la structure à partir des données MAD.

Nous avons cristallisé deux formes de la PMSR de *E. coli*, l'enzyme natif, et l'enzyme dans laquelle les 6 méthionines ont été substituées par des sélénométhionines ([SeMet]-PMSR). Les cristaux sont des bipyramides allongées de petite taille appartenant au système hexagonal avec des paramètres de maille de l'ordre de 103x103x293 Å. Un jeu de données de très bonne qualité a été collecté à 1.9Å de résolution sur la ligne BM30 de l'ESRF, pour l'enzyme natif. Les données MAD ont également été collectées sur les cristaux de [SeMet]-PMSR, à 3 longueurs d'onde à l'EMBL et à l'ESRF. Elles sont en cours d'exploitation.