



ÉCOLE DOCTORALE MÉDICAMENT TOXICOLOGIE CHIMIE ENVIRONNEMENT

**Doctorat
Chimie Biologique**

Etude biochimique d'un cytochrome P450 de cerveau humain : le CYP2U1

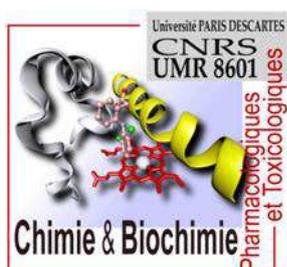
DUCASSOU Lionel

**Thèse dirigée par
BOUCHER Jean-Luc
Soutenue le 09 novembre 2012**

Jury :

CORCOS	Laurent	DR INSERM	rapporteur
CRESTEIL	Thierry	DR CNRS	rapporteur
BOUCHER	Jean-Luc	DR CNRS	directeur de thèse
ANDRE	François	CEA Saclay	
ETCHEBEST	Catherine	Prof. Université Paris Diderot	
GARBAY	Christiane	Prof. Université Paris Descartes	
LOMBARD	Murielle	CR CNRS	
URBAN	Philippe	CR CNRS	

Cette thèse a été préparée au :



UMR8601

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

45 rue des Saints Pères

75006 Cedex

☎ 01 42 86 21 69

Site <http://www.biomedicale.parisdescartes.fr/umr8601/>

Résumé :

Parmi les 57 cytochromes P450 identifiés lors du séquençage complet du génome humain, on en dénombre environ 15 dont on ne connaît pratiquement rien de leurs rôles physiologiques, de leurs substrats, et de leurs structures, d'où le nom de «P450 orphelins». Le CYP2U1 est l'un des cytochromes P450 les plus fortement exprimé au niveau du cerveau et du cervelet mais c'est aussi l'un des plus conservé parmi les différentes espèces du règne animal.

Ce travail de thèse a tout d'abord consisté à optimiser les conditions d'**expression du CYP2U1** sous une forme active. Un premier système d'expression dans la levure *Saccharomyces Cerevisiae* a permis une production d'un complexe CYP2U1-P450 réductase catalytiquement actif permettant des études de recherche de substrat. Un second système d'expression dans *Escherichia Coli* devrait permettre d'obtenir de plus grandes quantités d'enzyme soluble destinée à des études structurales.

Dans un second temps, une **recherche de substrats** a été effectuée à l'aide d'analyse d'incubats par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse. A ce jour, un screening dirigé de plus de soixante-dix molécules, substrats de P450s de la famille 2, a permis d'identifier les **premiers substrats exogènes** du CYP2U1, les analogues de terfénadone et la débrisoquine.

D'autre part, une **étude par modélisation moléculaire** de la structure du CYP2U1 a été effectuée. Cette étude montre que le CYP2U1 diffère de tous les autres P450s par la présence d'un **insert très spécifique** dans son domaine N-terminal. Des modèles par homologie basés sur les structures cristallographiques des P450s de la famille 2 ont été construits. Ces modèles ont été validés par dynamique moléculaire et ont permis de proposer un mode d'interaction avec la membrane, d'identifier la position des canaux d'accès ainsi que de déterminer la topologie du site actif. Enfin, un docking des premiers substrats exogènes au sein du site actif du CYP2U1 a permis de confirmer la régiosélectivité des hydroxylations catalysées par le CYP2U1.

Sommaire

CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	7
I.1 Les cytochromes P450.....	8
I.1.1 Présentation générale.....	8
I.1.2 Propriétés catalytiques.....	12
I.1.3 Caractéristiques structurales.....	21
I.1.4 Les cytochromes P450 humains.....	35
I.1.5 Les cytochromes P450 du cerveau.....	38
I.2 Les cytochromes P450 orphelins chez l’homme.....	39
I.2.1 Déorphelinisation en cours.....	39
I.2.2 Stratégies de « déorphelinisation ».....	42
I.3 Le cytochrome P450 2U1.....	44
I.3.1 Caractérisation génétique.....	44
I.3.2 Répartition dans les tissus.....	47
I.3.3 Caractérisation biologique.....	48
I.3.4 CYP2U1 et cancer.....	48
I.4 Objectifs de la thèse.....	49
CHAPITRE II. LE CYP2U1, UNE STRUCTURE SINGULIERE.....	50
II.1 Alignements multiples de séquences.....	51
II.1.1 Alignement des séquences de P450s de la famille 2.....	51
II.1.2 Deux inserts spécifiques du CYP2U1.....	52
II.2 Construction de modèles par homologie.....	53
II.2.1 Choix des domaines à modéliser.....	53
II.2.2 Construction, évaluation et comparaison des différents modèles.....	54
II.2.3 Topologie de l’insert N-terminal (modèle 2).....	60

II.2.4	Optimisation des deux modèles de CYP2U1 (modèles 1 & 2)	61
II.2.5	Description et comparaison des différents modèles	65
II.3	Interaction du CYP2U1 avec la membrane	67
II.3.1	Prédiction de l'orientation par rapport à une membrane cellulaire	67
II.3.2	Dynamique de 100 ns de modèles complets (CYP + membrane)	71
II.3.3	Interaction de l'insert avec la membrane.....	78
II.4	Etude de la topologie du site actif.....	81
II.4.1	Calcul Voidoo du volume de la cavité du site actif.....	81
II.4.2	Résidus tapissant la cavité du CYP2U1, description de la cavité	86
II.5	Evaluation des canaux d'accès au site actif	88
II.6	Conclusion	94
CHAPITRE III. PRODUCTION DU CYP2U1 DANS UN SYSTEME HETEROLOGUE.....		96
III.1	Choix des systèmes de production.....	97
III.1.1	Un système eucaryote adapté aux études enzymatiques, la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 97	
III.2	Caractérisation biochimique du cytochrome P450 2U1	99
III.2.1	Dosage spectroscopique	99
III.2.2	Immunodétection du CYP2U1 par Western-Blot.....	100
III.3	Conclusions.....	102
CHAPITRE IV. VERS DE NOUVEAUX SUBSTRATS DU CYP2U1.....		103
IV.1	Quels substrats pour un CYP orphelin ?.....	104
IV.1.1	Méthodologie.....	104
IV.1.2	Liste des molécules testées	104
IV.2	Métabolisme de la débrisoquine par le CYP2U1.....	107
IV.2.1	Régiosélectivité d'oxydation par le CYP2U1	110
IV.2.2	Cinétique d'hydroxylation de la débrisoquine par le CYP2U1.....	116

IV.2.3	Activités comparées de divers P450 humains	118
IV.2.4	Arrimage de la débrisoquine dans le site actif du CYP2U1	121
IV.3	Métabolisme des dérivés de la terfénadone par le CYP2U1.....	129
IV.3.1	Présentation de la famille de substrats.....	129
IV.3.2	Régioselectivité d'hydroxylation des analogues de terfénadone par le CYP2U1 ..	130
IV.3.3	Cinétique d'hydroxylation des analogues de terfénadone par le CYP2U1	133
IV.3.4	Arrimage de l'éthylterfénadone dans le site actif de l'enzyme	135
IV.4	Conclusions.....	144
CHAPITRE V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		146
CHAPITRE VI. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX		149
VI.1	Méthodes Bioinformatiques.....	150
VI.1.1	Génération de modèles par homologie et leur évaluation	150
VI.1.2	Recuits simulés sous Rosetta.....	151
VI.1.3	Dynamiques moléculaires sous AMBER	151
VI.1.4	Dynamiques moléculaires sous CHARMM	152
VI.1.5	Analyse des fichiers de dynamique	154
VI.1.6	Evaluation des canaux d'accès des substrats.....	155
VI.1.7	Evaluation du volume du site actif	157
VI.1.8	Docking de petites molécules dans le site actif des cytochromes P450	158
VI.2	Méthodes Biochimiques et Analytiques	160
VI.2.1	Milieux de culture et tampons	160
VI.2.2	Expression de la protéine recombinante dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	160
VI.2.3	Expression de la protéine recombinante dans <i>Escherichia coli</i>	164
VI.2.4	Microsomes commerciaux exprimant les cytochromes P450 humains.....	167
VI.2.5	Microsomes de foie de rat	167

VI.2.6	Origine des molécules testées.....	167
VI.2.7	Conditions d'incubation pour les études métaboliques	167
VI.2.8	CLHP-SM.....	168
VI.2.9	Détection par fluorimétrie des produits d'hydroxylation de la débrisoquine. Erreur !	
Signet non défini.		
VI.2.10	Analyse des fractions microsomales	169
VI.2.11	Spectroscopie RMN	171
CHAPITRE VII. ANNEXES		172
VII.1	Alignements	173
VII.1.1	Alignement des 16 P450s humains de la famille 2.....	173
VII.1.2	Alignement pour Modeller	175
VII.2	Scripts et données bioinformatiques	176
VII.2.1	Script Modeller	176
VII.2.2	Fichiers de topologie pour l'hème et le résidu CYQ.....	177
VII.3	Un système procaryote adapté aux études structurales, la bactérie <i>Escherichia coli</i>	179
VII.3.1	Modifications du gène du CYP2U1.....	179
VII.3.2	Un isoforme sensible	179
VII.3.3	Caractérisation du CYP2U1 exprimée dans <i>E. coli</i>	180
VII.4	Gradients CLHP	181
VII.4.1	Analogues de terfénadone	181
VII.4.2	Débrisoquine et ses analogues.....	181
VII.4.3	Autres molécules testées.....	182
CHAPITRE VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		183

CHAPITRE I. INTRODUCTION

I.1 Les cytochromes P450

I.1.1 Présentation générale

I.1.1.1 Genèse du métabolisme des xénobiotiques

La découverte des cytochromes P450 s'est faite dans la continuité des études menées sur la détoxification de composés exogènes, les xénobiotiques. Ces études ont débuté chez le chien dès 1824 puis chez l'homme à partir de 1841 (Wöhler 1824; Ure 1841; Li, Baudry et al. 2004).

La première réaction caractérisée fut la conjugaison de la glycine à l'acide benzoïque. En 1841 et 1842, deux scientifiques ont ingéré de l'acide benzoïque et ont observé l'excrétion en grande quantité dans leurs urines d'un produit inconnu (Ure 1841; Keller 1842; Conti and Bickel 1977). Ce produit est similaire à l'acide benzoïque mais contient aussi de l'azote. L'identification de cette molécule inconnue comme étant l'acide hippurique (voir Figure I.1), formée par conjugaison de l'acide benzoïque avec un équivalent de glycine endogène est établie en 1845 par un scientifique français, Victor Dessaignes (Dessaignes 1845). De ces expériences, bien que rudimentaires, a émergé un paradigme fondateur pour le métabolisme : l'organisme est capable de prendre en charge des molécules exogènes, de leur faire subir des réactions chimiques puis de les excréter via les urines sous une forme chimiquement altérée.

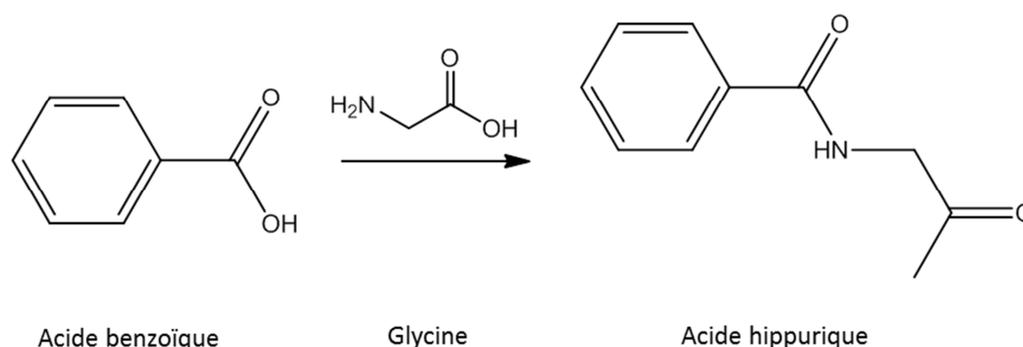


Figure I.1 : détoxification de l'acide benzoïque chez l'homme

Lors des décennies suivantes, de nombreuses nouvelles réactions du métabolisme ont été découvertes et ce, principalement par des scientifiques et laboratoires allemands à la pointe de la chimie dans cette deuxième partie du XIX^{ème} siècle. Ainsi Wöhler et Frerichs (1848) ont montré que le benzaldéhyde était métabolisé en acide benzoïque chez le chien (Conti, Harwood et al. 1977), la première méthylation fut décrite en 1887 par His (His 1887) qui, après avoir fait ingérer de l'acétate de pyridine à un chien, a isolé un métabolite N-méthylé dans ses urines. Par la suite, en 1879, il fut

démontré que le camphre était éliminé dans les urines sous forme d'un adduit glucuronique (Schmiedeberg 1879).

A la fin du XIX^{ème} siècle, pour chacune des principales voies de métabolisme, un ou plusieurs exemples avaient été publiés. Cependant, les mécanismes chimiques mis en jeu pour ces transformations restaient inconnus.

Toutes ces observations ont mené Williams à énoncer les principes fondamentaux de la détoxification des xénobiotiques par les organismes vivants (Williams 1947). Celle-ci s'effectue en deux étapes (voir Figure I. 2) :

- La première phase de **fonctionnalisation** (ou **phase I**) du composé exogène permet d'introduire une fonction hydrophile. Cette fonction est ajoutée le plus souvent par oxydation. Dans certains cas, elle peut apparaître suite à une réduction ou une hydrolyse. Le composé exogène est donc transformé en une molécule plus hydrophile qui peut ainsi être prise en charge par les voies d'excrétion (urinaire ou biliaire).
- Si le métabolite de phase I n'est pas assez hydrophile pour être excrété, il va subir la seconde phase de détoxification dite phase de **conjugaison** (ou **phase II**) qui consiste à former un adduit avec un composé endogène très hydrophile comme l'ion sulfate, le glutathion ou l'acide glucuronique. Le composé conjugué, beaucoup plus hydrosoluble pourra être excrété.

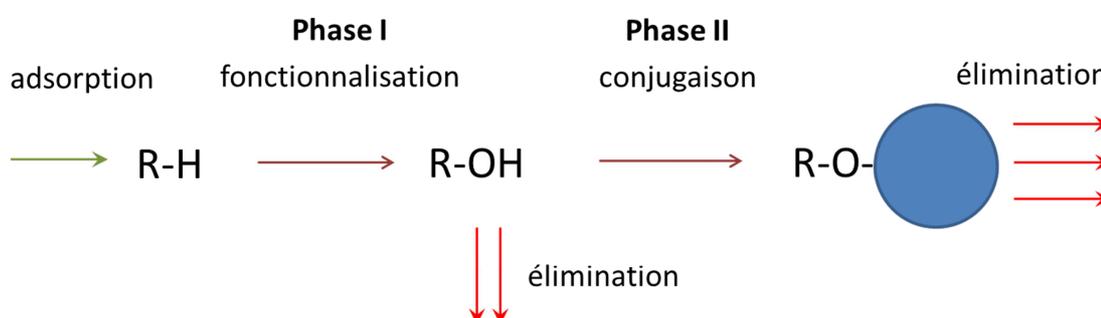


Figure I. 2 : Les mécanismes de détoxification des xénobiotiques.

Ce n'est qu'à partir des années 1950 que débute les premières études biochimiques et mécanistiques du métabolisme. Elles s'orientent logiquement vers le foie qui, par sa position intermédiaire entre l'intestin et la circulation systémique, doit être impliqué dans le métabolisme de xénobiotiques. Dans cette optique, Mueller et Miller mettent en évidence *in vitro* l'implication des cellules hépatiques dans la biotransformation du diméthylaminobenzène chez le rat (Mueller and Miller 1949). Plus tard, J. Axelrod et B. Brodie découvrent que des enzymes hépatiques membranaires

sont capables d'oxyder des composés exogènes en présence de NADPH et de dioxygène (Axelrod 1955; Brodie, Axelrod et al. 1955).

1.1.1.2 Découverte et identification des cytochromes P450

A la même époque, deux événements majeurs ont initié la recherche sur les cytochromes P450, à savoir l'isolation de la fraction microsomale de tissus animaux (Claude 1943; Palade and Siekevitz 1956) et la détection des premières activités enzymatique de type oxygénase pour lesquelles la source d'oxygène est le dioxygène (Ure 1841; Hayano, Lindberg et al. 1955).

En 1958, Klingenberg et Garfinkel mirent en évidence la présence d'un pigment dans les fractions microsomales hépatiques de rat et de cochon qui, réduit par du NADPH ou du dithionite et en présence de monoxyde de carbone présentait une absorption spécifique à 450 nm (Garfinkel 1958; Klingenberg 1958). Les travaux de Omura et Sato permirent d'identifier ces pigments, en montrant qu'il s'agissait d'hémoprotéines, qui seront appelés par la suite « cytochrome P450 » (Omura and Sato 1962), le P faisant référence à son cofacteur, la protoporphyrine IX et 450 à la longueur d'onde d'absorption du complexe Fe^{II}-CO. Toutefois, la nature du ligand axial coordonnant l'hème reste un mystère : dans les hémoprotéines connues à cette époque, la protoporphyrine est toujours coordonnée à un imidazole d'histidine en position axiale et présente un spectre d'absorption différentiel avec un pic à 420 nm. L'effet bathochrome observé indique donc l'existence d'un nouveau type de liaison au fer. Ce n'est qu'en 1974, que le rôle d'un ligand cystéinate a été établi (Stern and Peisach 1974).

Au cours des années 60, l'implication des cytochromes P450 a été démontrée dans la biotransformation des stéroïdes (Estabrook, Cooper et al. 1963) puis dans l'oxydation de composés exogènes (Cooper, Levin et al. 1965). En 1968, le premier P450 est purifié, il s'agit d'une protéine soluble issue de la bactérie *Pseudomonas putida* et catalysant l'hydroxylation du camphre en 5-exo-hydroxycamphre (Katagiri, Ganguli et al. 1968).

Enfin, il a fallu attendre les années 70-80 pour que soient élucidées les principales étapes du cycle catalytique des P450s et notamment les mécanismes d'activation de l'oxygène (Groves and McClusky 1976).

I.1.1.3 Une grande diversité de gènes

L'optimisation des techniques de séquençage des génomes ces quinze dernières années a permis la découverte d'un nombre exponentiel de gènes codant pour des cytochromes P450. Ces données sont regroupées dans une base de données qui rassemble les différentes séquences de P450 (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>). En août 2009, 11294 différentes gènes codants pour des P450s étaient alors identifiés. Ils sont présents dans tout le règne du vivant : on retrouve ainsi des représentants de cette superfamille chez les animaux, les plantes, les champignons, les bactéries, les archaebactéries, les protistes et récemment, deux gènes de P450s ont même été découverts dans le génome d'un virus (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*) (Lamb, Lei et al. 2009).

Le nombre de gènes de P450 présents dans une espèce est quant à lui, très variable. Ainsi, l'homme possède 57 gènes tandis que l'on dénombre 246 gènes chez *A. thaliana* (Ortiz de Montellano 2005) et jusqu'à plus de 300 gènes dans le riz (Ingelman-Sundberg 2005).

Malgré cette grande diversité de gènes, la superfamille des cytochromes P450 est caractérisée par deux signatures dans la séquence protéique qui sont représentées en Figure I. 3.

La première est située du côté proximal de l'hème. Ce motif, **FxxGx(R/H)CxG**, appelé Cys-Pocket contient la cystéine coordonnant l'hème et est particulièrement bien conservée aussi bien au niveau structural qu'au niveau de la séquence primaire car cette structure assure la stabilité du cystéinate liant l'hème par un jeu de liaisons hydrogènes entre résidus voisins. C'est aussi la signature historique des P450s, utilisée dans la base de données PROSITE (Sigrist, Cerutti et al. 2010) sous la forme : [FW]-[SGNH] -x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD].

La seconde séquence consensus, située du côté distal de l'hème, **[G/A]Gx[E/D]Tx**, est moins bien conservée que la première et joue un rôle au cours de l'activation du dioxygène dans le cycle catalytique de l'enzyme.

CYP3A4 (homme)	305	A	G	Y	E	T	T	310	435	F	G	S	G	P	R	N	C	I	G	444
CYP101 (Cam.)	249	G	G	L	D	T	V	254	351	F	G	H	G	S	H	L	C	L	G	360
CYP2U1 (homme)	352	A	G	T	D	T	T	357	483	F	G	I	G	K	R	V	C	M	G	492
CYP107L (<i>Step. plat.</i>)	234	A	G	H	E	T	T	239	339	F	G	H	G	I	H	Y	C	F	G	348
consensus		G/A	G	x	E/D	T	x			F	x	x	G	x	R/H	x	C	x	G	

Figure I. 3 : Séquences consensus des cytochromes P450

1.1.1.4 Nomenclature

A l'origine, les P450s étaient désignés par leur principal substrat. Par exemple, le P450 ayant pour substrat le camphre était appelé P450_{CAM}. Cette nomenclature était pertinente à une époque où peu de P450 étaient caractérisés. Mais très vite, cette technique a atteint ses limites : deux P450s peuvent partager un même substrat ou un P450 peut ne pas avoir de substrat connu ; comment nommer ces nouvelles enzymes ?

De ce fait, une nomenclature alpha numérique basée sur l'identité de séquence a été progressivement définie (Nelson 1998). Ainsi, deux P450s sont de la même famille si leur identité de séquence est supérieure à 40% et de la même sous-famille pour une identité de séquence supérieure à 55%. Par exemple, le P450 dénommé CYP2U1 appartient à la famille 2 et à la sous-famille U et le CYP46A1 appartient à la famille 46 et à la sous-famille A.

1.1.2 Propriétés catalytiques

1.1.2.1 Réactions catalysées par les cytochromes P450

Les cytochromes P450 catalysent des réactions de mono-oxygénation, dont les plus connues sont des hydroxylations et des époxydations (Figure I. 4). Ces réactions nécessitent la présence de dioxygène ainsi que d'un cofacteur apportant les électrons nécessaires (le NADPH ou le NADH).

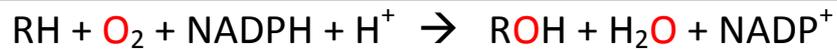
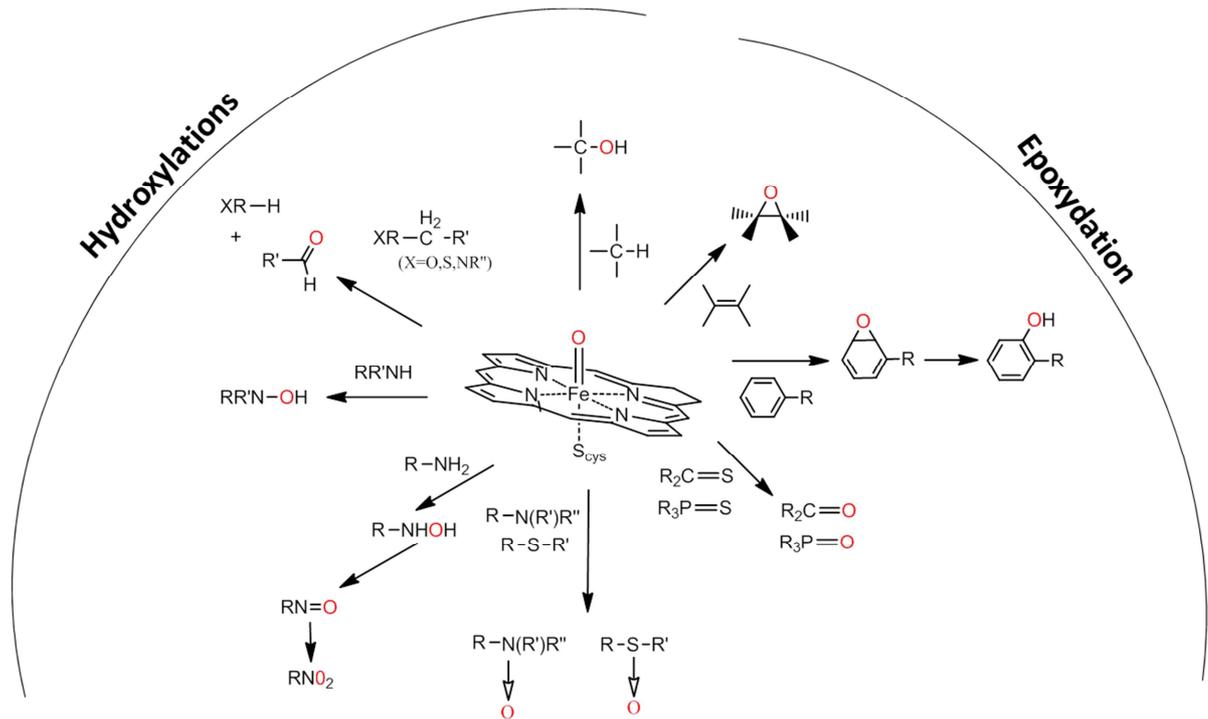


Figure I. 4 : Principales réactions d'oxydation catalysées par les cytochromes P450. D'après Mansuy et Battioni (Mansuy and Battioni 2000)

Par ailleurs, diverses autres réactions comme des déshydratations, des isomérisations et des réductions ont aussi été observées (Ortiz de Montellano 2005).

Cette réactivité propre aux CYPs s'explique par la présence au sein du site actif d'un hème (protoporphyrine IX de Fer) relié à l'apoprotéine par un groupement cystéinate formant une liaison avec le fer (Figure I. 5)

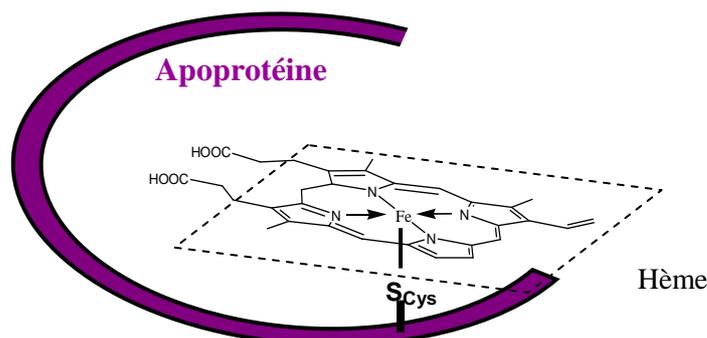


Figure I. 5: Représentation schématique des P450s

I.1.2.2 La chaîne de transfert d'électrons

La transmission des électrons jusqu'à la protoporphyrine se fait via plusieurs protéines de transfert d'électrons telles que la cytochrome P450 réductase (CPR). Il existe dix classes de P450s selon le système de transfert d'électrons qu'ils utilisent (Hannemann, Bichet et al. 2007). Cependant, on distingue essentiellement deux classes de P450s (classe I et classe II) qui correspondent aux modes de transfert d'électrons les plus fréquemment rencontrés.

Les P450s de **classe I**, correspondent, sauf exceptions, aux enzymes bactériennes et mitochondriales. La chaîne de transfert d'électrons est constituée de deux partenaires rédox : une protéine à centre fer-soufre (la ferrédoxine) et la ferrédoxine réductase. Les électrons sont d'abord prélevés par la ferrédoxine réductase via son cofacteur FAD puis transférés sur le centre fer-soufre de la ferrédoxine et enfin sur le P450 pour permettre la catalyse.

Les P450s de **classe II**, correspondent en partie aux enzymes microsomales et reçoivent leurs électrons d'un seul partenaire rédox, la cytochrome P450 réductase. Cette protéine ancrée comme le P450 à la membrane du réticulum endoplasmique possède deux cofacteurs (FMN et FAD) en charge du transfert d'électrons vers le P450. Un second système, non spécifique aux P450s, peut aussi participer au transfert d'électrons : le cytochrome *b5* peut transférer des électrons du NADPH vers certains P450s (Schenkman and Jansson 1999).

Bien que les partenaires rédox des P450s soient généralement exprimés de façon indépendante, il existe, chez certaines bactéries et certains champignons, des systèmes de type P450 pour lesquels il y a eu fusion au cours de l'évolution des gènes de P450 avec celui (ceux) de partenaire(s) rédox. Cette

fusion d'un domaine oxygénase à un domaine réductase se retrouve aussi chez l'homme dans une famille enzymatique voisine : les NO synthases.

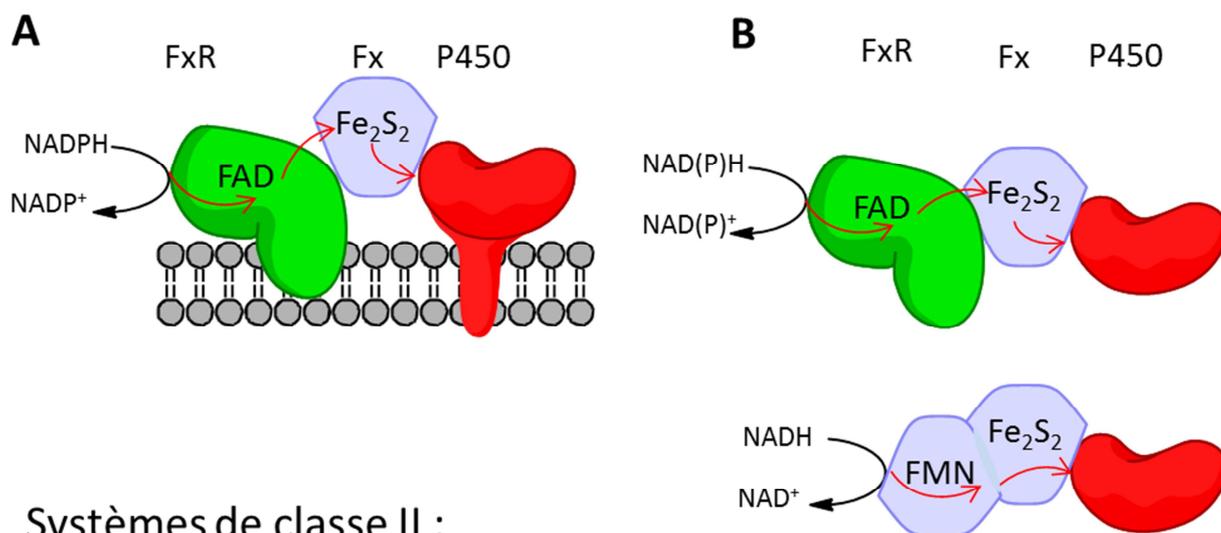
La protéine P450RhF issu de *Rhodococcus sp* est un exemple de protéine de fusion ; on peut la classer comme un P450 de classe I (Roberts, Grogan et al. 2002). Cette protéine possède un domaine réductase à flavine FMN, fusionné à un domaine à centre fer-soufre et à un domaine P450.

Il existe un autre type de protéine de fusion plus proche d'un système de classe II. Ainsi, le P450_{BM3} de *Bacillus megaterium*, qui catalyse l'hydroxylation en ω -2 d'acides gras et dont le domaine P450 est fusionné en C-terminal à un domaine réductase à deux flavines (Munro, Leys et al. 2002).

Les P450s catalysant des réactions d'isomérisation ou de déshydratation ne nécessitent pas l'apport d'électron via un système rédox et/ou ne nécessitent pas l'entrée de dioxygène au site actif. Les substrats transformés lors de ces réactions sont souvent riches en électrons, tels que des alkylhydroperoxydes ou des hydroperoxydes (Mansuy 1998). Ces enzymes sont impliquées dans la biosynthèse de molécules de voies de signalisation telles que les prostaglandines chez les mammifères. Bien qu'aucun système de transfert ne soit nécessaire à l'activité, on définit quand même une **classe III**, qui englobe ces systèmes.

Enfin, un P450 qui reçoit directement ses électrons du NADPH a aussi été décrit et constitue à lui seul la **classe IV**. L'unique représentant actuel de cette classe est le P450_{NOR} qui catalyse la réduction du NO en N₂O (Takaya, Suzuki et al. 1999).

Systèmes de classe I :



Systèmes de classe II :

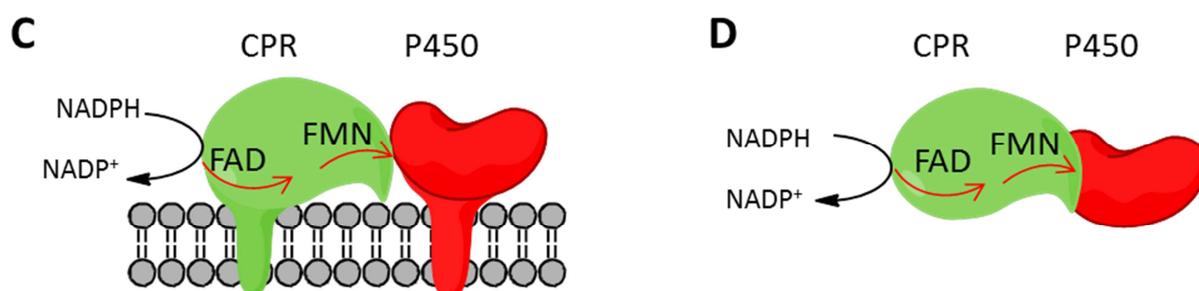


Figure I. 6: Les partenaires de transport d'électrons des P450s. La classe I comprend les P450 mitochondriaux (**A**), la plus grande partie des systèmes solubles et certains systèmes fusionnés de type P450_{RhF} (**B**). La classe II comprend les P450 microsomaux (**C**) et les systèmes fusionnés du type P450 BM3 (**D**). **FxR** : ferrédoxine réductase, **Fx** : ferrédoxine, **CPR** : cytochrome P450 réductase. Les flèches rouges correspondent au transfert d'électrons du cofacteur jusqu'au P450.

1.1.2.3 Le cycle catalytique

Le cycle catalytique conduisant à l'oxydation d'un substrat se déroule en trois grandes étapes : fixation du substrat, fixation et activation du dioxygène et oxydation du substrat qui quitte alors le site actif du P450.

Au repos, le Fe^{III} est en équilibre entre deux états : une forme haut-spin ($S=5/2$) pentacoordinée et une forme bas-spin ($S=1/2$) hexacoordinée (le sixième ligand étant une molécule d'eau). Le cycle catalytique est initié par l'entrée du substrat au sein du site actif (voir Figure I. 7 – (1)). Cette association avec le substrat modifie le potentiel rédox du Fer, ce qui permet le transfert

d'un premier électron issu de la cytochrome P450 réductase (Guengerich and Johnson 1997). Cette réduction est suivie de la fixation de dioxygène donnant naissance au complexe (3). Le transfert d'un nouvel électron (4) depuis la cytochrome P450 réductase permet la formation d'un complexe de type peroxyferrique (Sansen, Yano et al. 2007) qui par protonation (5) conduit à l'hydropéroxyde [$\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$]. La deuxième protonation (6) mène à une rupture homolytique de la liaison O-O avec le départ d'une molécule d'eau et la formation d'un complexe à haut degré d'oxydation, le fer-oxo [$\text{Fe}^{\text{V}}\text{=O}$] qui a été mis en évidence pour la première fois par Rittle et Green en 2010 (Rittle and Green 2010). Cette entité transfère alors son oxygène au substrat (6). Enfin, le métabolite (produit d'oxydation) est libéré (Bosch, Dinklage et al.); l'hème retrouve son état initial.

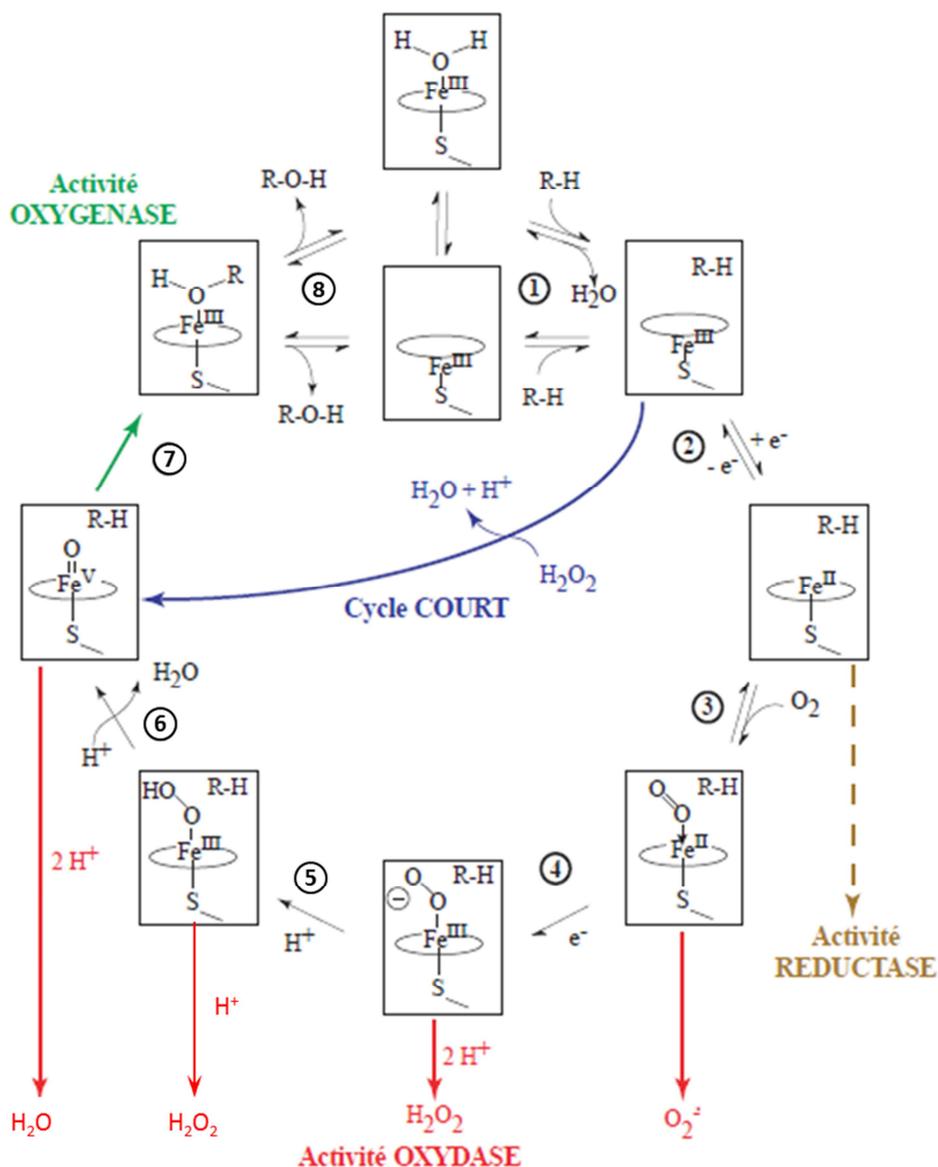


Figure I. 7: Le cycle catalytique des P450s. Les voies abortives, non productives (découplage) sont indiquées en rouge, le cycle court (en bleu) est obtenu par addition d'espèces riches en oxygène, la voie réductase est indiquée en marron. D'après la thèse de P.

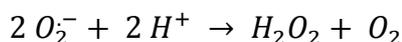
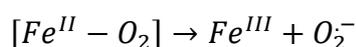
Lafite (Lafite 2007)

Une étude de l'époxydation des oléfines a aussi démontré que dans certains cas, l'oxydation du substrat peut se faire à partir de deux espèces électrophiles : le fer-oxo [$\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$] mais aussi l'espèce hydroperoxyde [$\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$] (Vaz, McGinnity et al. 1998).

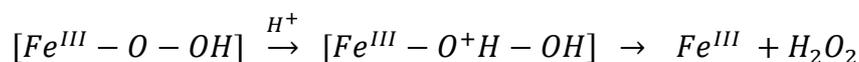
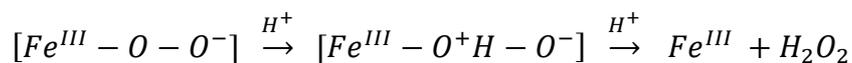
L'utilisation d'agents oxydants donneurs d'atomes d'oxygène (H_2O_2 , hydroperoxydes, peracides,...) permet d'obtenir directement le Fer-oxo à partir de l'état natif (en bleu sur la Figure I. 7).

Ce cycle catalytique idéal aboutit à la formation d'un métabolite pour chaque molécule de substrat et de NAD(P)H entrant dans le cycle. Toutefois, il arrive que ce couplage ne soit pas efficace et dans ce cas, bien qu'il y ait consommation de NAD(P)H, le substrat n'est pas oxydé (voies en rouge sur la Figure I. 8). On parle alors de voies abortives ou non productives (découplage). Ceci se traduit par un retour à l'état natif du complexe et par la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ce découplage entre le transfert d'électrons et le transfert d'atomes peut avoir lieu au niveau de plusieurs étapes du cycle catalytique :

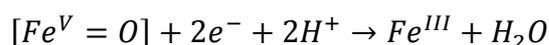
- Le complexe ferreux $[Fe^{II} - O_2]$ (étape 3) peut se décomposer, l'ion superoxyde ainsi généré pourra se dismuter et former du peroxyde d'hydrogène.



- L'addition d'un proton sur l'oxygène proximal coordonnant le fer du complexe ferrique $[Fe^{III} - O_2]^-$ (étape 4) ou de son équivalent hydroperoxo (étape 5), va conduire à la formation d'un équivalent de peroxyde d'hydrogène.



- L'espèce fer-oxo (étape 6) peut elle aussi redonner l'état natif en consommant deux protons et deux électrons.



1.1.2.4 Caractérisation spectrale de l'interaction entre l'hème et un composé fixé au site actif

A l'état **natif**, le complexe de Fe^{III} est en équilibre entre ses deux formes : un état haut spin pentacoordiné dans lequel le fer est en dehors du plan de l'hème et qui possède un maximum d'absorption aux environs de 390 nm et un état bas spin hexacoordiné absorbant à 420 nm dans lequel le fer est dans le plan de l'hème (voir Figure I. 8).

Lors de l'entrée d'un composé qui se fixe au site actif, la signature spectrale dans le domaine UV-visible du complexe va être modifiée. On distingue trois cas de figure (Schenkman, Sligar et al. 1981) :

- Le composé hydrophobe entre dans le site actif et chasse la molécule d'eau qui coordine le fer. Le complexe se retrouve alors majoritairement sous forme pentacoordinée, avec un maximum d'absorption à 390 nm. On observe alors un spectre de différence (par rapport à l'état natif) avec un pic à 390 nm et une vallée à 420 nm. On parle alors d'**interaction de type I** qui est l'interaction la plus fréquemment rencontrée.
- Le composé hydrophobe porte cette fois un atome d'oxygène capable de coordiner le fer de l'hème et qui se substitue à la molécule d'eau comme sixième ligand du fer. Cette espèce est Fe^{III} bas spin avec un pic de Soret à 420 nm. On observe donc un spectre de différence résultant avec un pic à 420 nm et une vallée à 390 nm. On parle alors d'**interaction de type I inversé**.
- Le composé hydrophobe porte cette fois un atome d'azote ou de soufre accessible capable de coordiner le fer de l'hème et qui se substitue à la molécule d'eau comme sixième ligand du fer. Cette espèce est Fe^{III} bas spin avec un pic de Soret entre 425 et 435 nm. On observe alors un spectre de différence résultant avec un pic entre 425 et 435 nm et une vallée entre 390 et 410 nm. On parle alors d'**interaction de type II**.

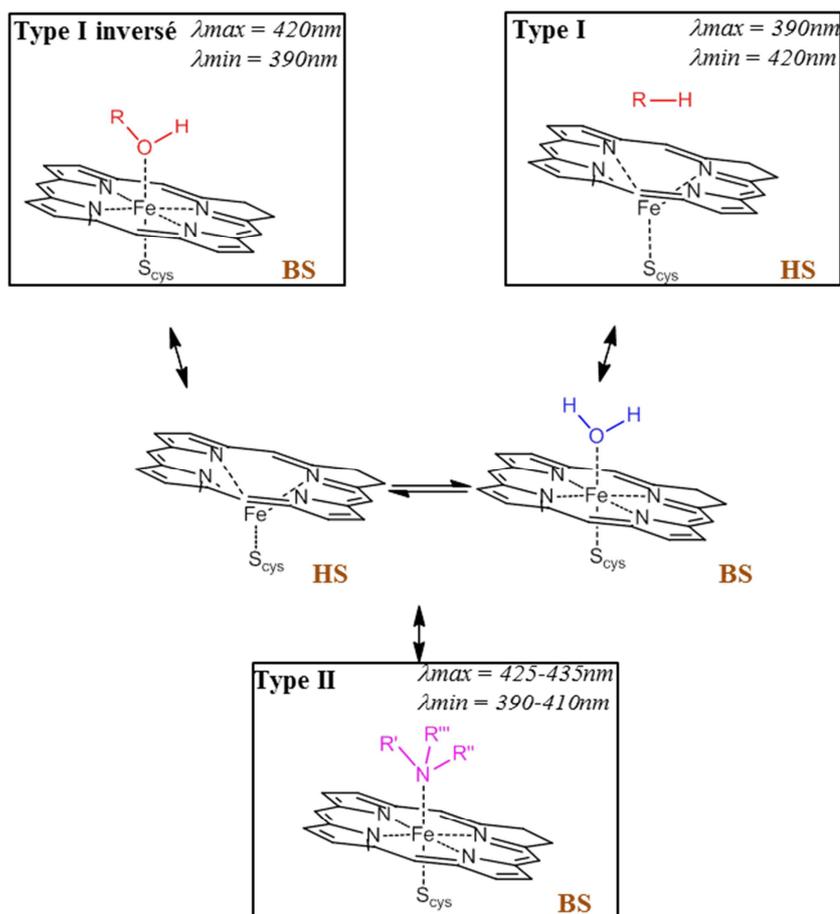


Figure I. 8 : Différentes interactions structurales observées lors de la fixation d'un composé au site actif d'un P450. (Schenkman, Sligar et al. 1981; Mansuy, Battioni et al. 1989). BS : bas spin, HS : haut spin

I.1.3 Caractéristiques structurales

I.1.3.1 Un nombre de structures connues en expansion

Depuis le dépôt de la première structure de cytochrome P450 bactérien en 1985 (P450_{CAM} renommé CYP101) (Poulos, Finzel et al. 1985), le nombre de structures déposées sur la Protein Data Bank (PDB - accessible à l'adresse <http://www.rcsb.org>) n'a cessé de croître de façon exponentielle (voir Figure I. 9) et présente aujourd'hui¹ 391 structures différentes de P450s. La majorité des structures résolues sont issues de bactéries (270 entrées dans la PDB). On compte 112 structures de protéines d'eucaryotes (85 de mammifères, 15 de champignons, 10 de plantes et 2 de poisson) et 9 structures de P450 d'archaebactéries.

¹ au 13 mars 2012

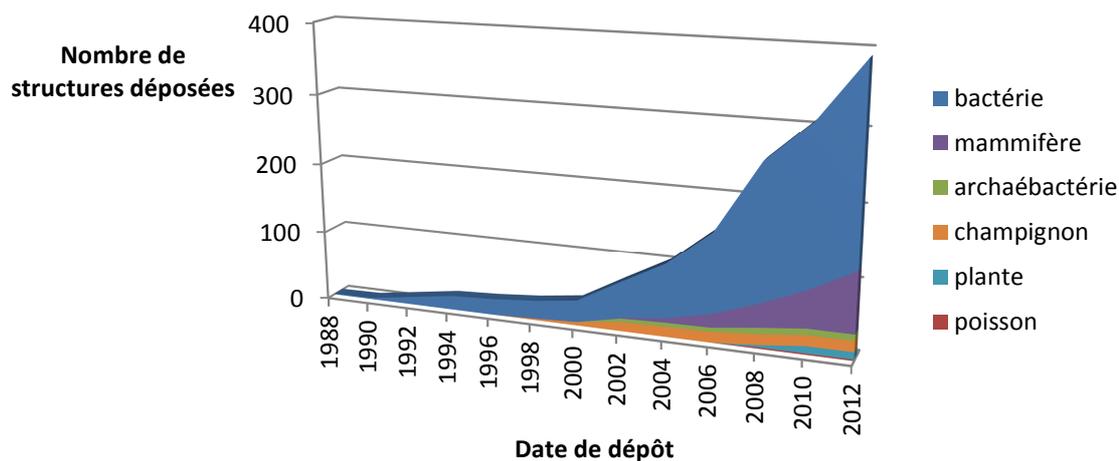


Figure I. 9 : Evolution du nombre de structures de CYPs déposée à la Protein Data Bank.

Le premier P450 cristallisé dont la structure haute définition aux rayons X a été résolue est le cytochrome P450_{CAM} (CYP101), issu de *Pseudomonas putida*, et qui catalyse l'hydroxylation régio- et stéréo- spécifique du camphre en 5-exo-hydroxycamphre (Poulos, Finzel et al. 1987). Cette structure d'un P450 soluble est restée longtemps un paradigme pour l'étude des relations structure-fonction des P450s, jusqu'à la résolution d'autres structures de P450s solubles au cours de la décennie suivante.

Les structures des P450s membranaires de mammifères sont quant à elles restées longtemps inconnues, la cristallisation de domaines membranaires s'avérant extrêmement difficile. Il a donc fallu attendre 2000 pour que soit déposée la première structure de P450 de mammifère (Williams, Cosme et al. 2000). Cette structure du CYP2C5, une isoforme de lapin, a été résolue après plusieurs mutations de sa séquence et surtout la troncature de l'unique domaine transmembranaire (en position N-terminale) qui a été remplacé par un peptide hydrophile, rendant la protéine soluble. Il est accepté que ces modifications faites aux protéines membranaires n'affectent en rien leur repliement, ni leur fonction, dans la mesure où celle-ci conservent leurs activités enzymatiques (Cosme and Johnson 2000; Pan, Abd-Rashid et al. 2011). Cette technique a été ensuite largement adaptée à la résolution de structures de P450 membranaires. Le premier P450 humain, le CYP2C8, a ainsi été cristallisé en 2004 (Schoch, Yano et al. 2004) et, à ce jour 21 structures de P450s de mammifères différents ont été résolues (80 structures déposées à la PDB), dont les principales sont répertoriées dans le Tableau I. 1. On notera que la famille 2 a été la plus étudiée avec 10 des 16 isoformes présentes chez l'homme dont la structure a été résolue (voir aussi Tableau I. 3).

CYP	Entrées PDB	Résolution (Å)	Source	Référence
CYP1A2	2HI4	1.95	<i>Homo sapiens</i>	(Sansen, Yano et al. 2007)
CYP1B1	3PM0	2.70	<i>Homo sapiens</i>	(Wang, Savas et al. 2011)
CYP2A13	(2 structures) dont 2P85	2.35	<i>Homo sapiens</i>	(Smith, Sanders et al. 2007)
CYP2A6	(12 structures) dont 2PG5	1.95	<i>Homo sapiens</i>	(Sansen, Hsu et al. 2007)
CYP2B4	(12 structures) dont 3MVR	1.76	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	(Wilderman, Shah et al. 2010)
CYP2B6	(3 structures) dont 3IBD	2.00	<i>Homo sapiens</i>	(Gay, Shah et al. 2010)
CYP2C5	(2 structures) dont 1NR6	2.10	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	(Wester, Johnson et al. 2003)
CYP2C8	(5 structures) dont 2NNH	2.60	<i>Homo sapiens</i>	(Schoch, Yano et al. 2008)
CYP2C9	(3 structures) dont 1R9O	2.00	<i>Homo sapiens</i>	(Wester, Yano et al. 2004)
CYP2D6	(2 structures) dont 3QM4	2.85	<i>Homo sapiens</i>	(Wang, Savas et al. 2012)
CYP2E1	(6 structures) dont 3T3Z	2.35	<i>Homo sapiens</i>	(Devore, Meneely et al. 2011)
CYP2R1	(3 structures) dont 3CZH	2.30	<i>Homo sapiens</i>	(Strushkevich, Usanov et al. 2008)
CYP3A4	(9 structures) dont 3NXU	2.00	<i>Homo sapiens</i>	(Sevrioukova and Poulos 2010)
CYP7A1	(2 structures) dont 3SN5	2.75	<i>Homo sapiens</i>	n/p
CYP8A1	(2 structures) dont 3B6H	1.62	<i>Homo sapiens</i>	(Li, Chiang et al. 2008)
CYP19A1	3EQM	2.90	<i>Homo sapiens</i>	(Ghosh, Griswold et al. 2009)
CYP17A1	(2 structures) dont 3SWZ	2.40	<i>Homo sapiens</i>	(DeVore and Scott 2012)
CYP21A2	3QZ1	3.00	<i>Bos taurus</i>	n/p
CYP24A1	(2 structures) dont 3K9V	2.50	<i>Rattus norvegicus</i>	(Annalora, Goodin et al. 2010)
CYP46A1	(6 structures) dont 3MDM	1.60	<i>Homo sapiens</i>	(Mast, White et al. 2008)
CYP51A1	(3 structures) dont 3I3K	2.80	<i>Homo sapiens</i>	(Strushkevich, Usanov et al. 2010)

Tableau I. 1: Les 80 structures des P450s de mammifères déposés à la Protéine Data Bank. Structures déposées avant le 08/03/12. n/p : non publié

1.1.3.2 Un repliement très conservé

Pour tous les P450s, qu'ils soient solubles ou membranaires, de classe I, II, III ou IV, et malgré de faibles pourcentages d'identité entre leurs séquences protéiques primaires (le P450_{CAM} bactérien et le CYP3A4 humain ne partagent que 23 % d'identité de séquence protéique) le repliement général et la topologie de tous les P450s cristallisés sont identiques. Toutes les structures cristallographiques de

P450s ont une forme de prisme à base triangulaire dont la hauteur, pour la partie non membranaire, mesure environ 70Å pour une base de 40Å (voir Figure I. 10). Ce repliement est caractéristique des P450s et n'a été, à ce jour, retrouvé pour aucune autre protéine n'appartenant pas à la super-famille de P450.

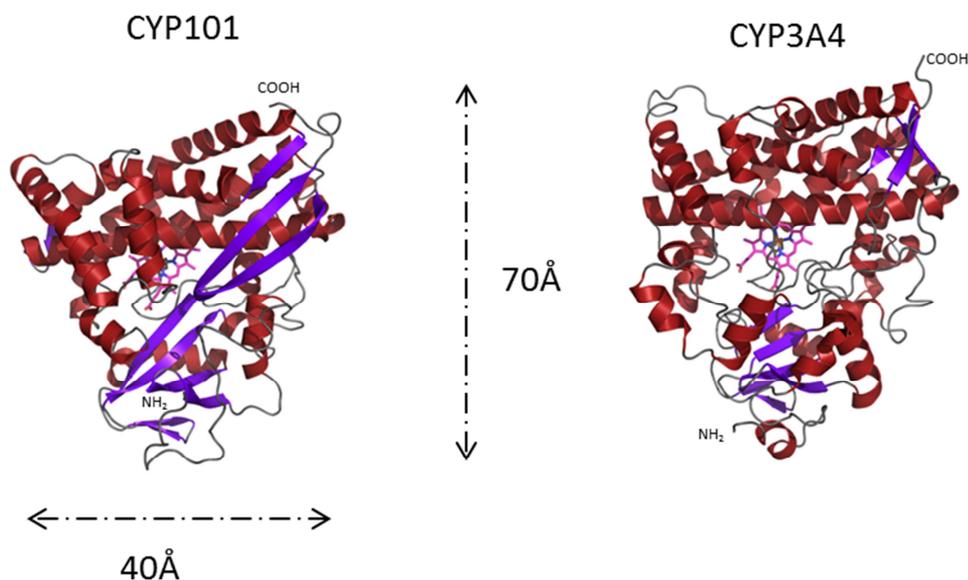


Figure I. 10 : Comparaison d'une structure de P450 bactérien avec une de P450 de mammifère. Le CYP101 (code PDB : 2CCP) et le CYP3A4 (code PDB ITQN) sont représentés selon la même orientation. Les hélices sont colorées en rouge, les feuillets β en mauve, l'hème est représenté en bâtons roses. Le reste de la protéine est en gris

La nomenclature utilisée pour les éléments de structures secondaires est celle définie par Poulos en 1985 (Poulos, Finzel et al. 1985) lors de la publication de la toute première structure de P450, le P450_{CAM}. Les 12 hélices α sont identifiées par des lettres majuscules (de A à L). Les feuillets β sont eux numérotés de 1 à 5. Cette nomenclature a ensuite été enrichie au fur et à mesure de la découverte de nouvelles structures secondaires. De courtes hélices additionnelles ont été identifiées dans les structures résolues postérieurement. Elles ont été nommées B', F',... en fonction du nom de l'hélice qui les précède.

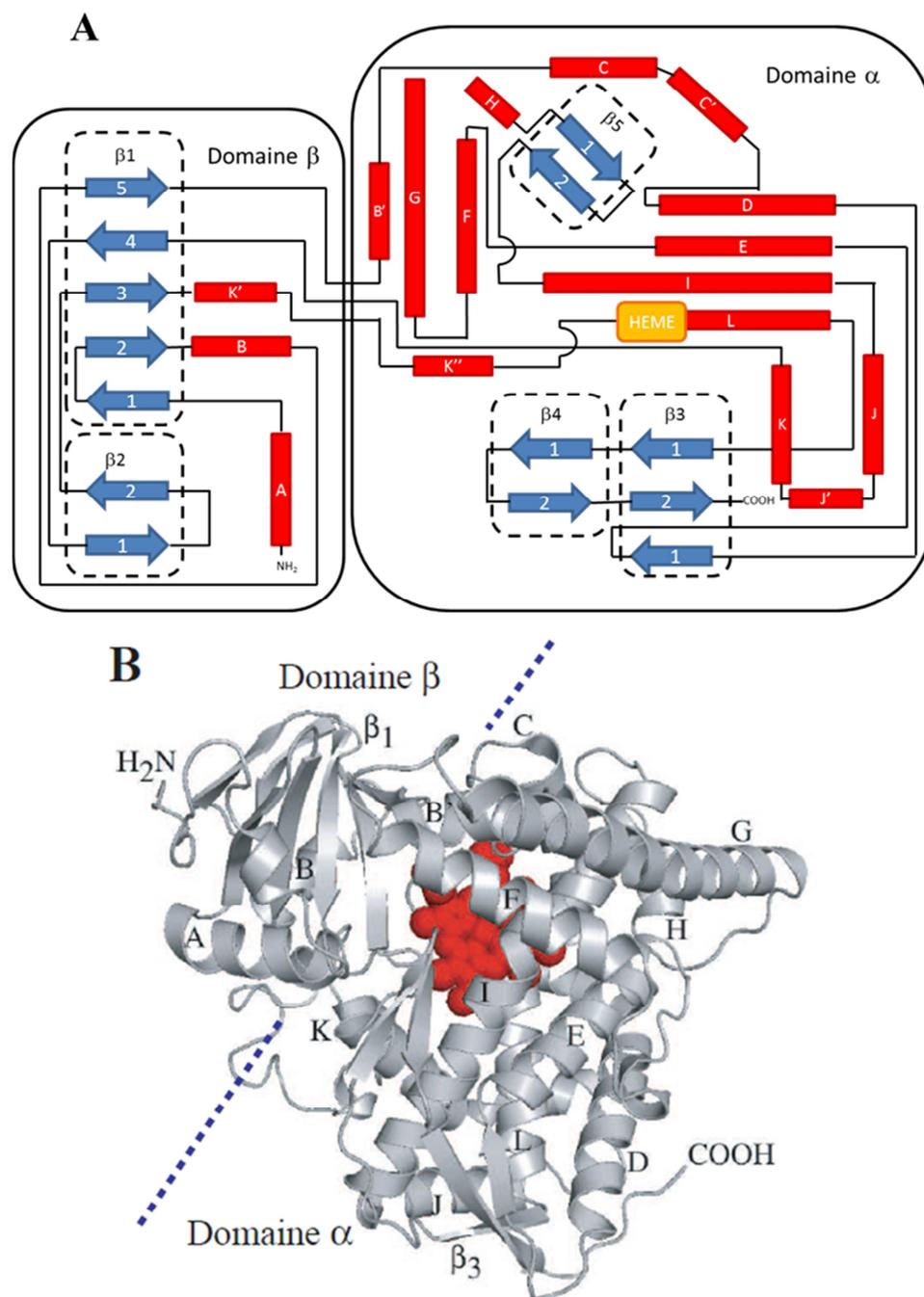


Figure I. 11: (A) Topologie et éléments de structures secondaires du cytochrome P450 BM-3 d'après Graham et Peterson (Graham and Peterson 1999) Les hélices sont représentées en barres rouges de longueur proportionnelle à la taille de l'hélice, les brins β par des flèches bleues et l'hème par un carré orange. (B) Structure du cytochrome P450 BM-3 annotée (code PDB 2HPD). Les hélices C', J', K' et K'' ainsi que les feuillets 2,4 et 5 ne sont pas indiqués par souci de visibilité.

On distingue deux régions dans la structure des P450s : un domaine α riche en hélices α bien structuré et un domaine β composé essentiellement de feuillets et de boucles qui présente une flexibilité plus importante (Figure I. 11).

Les régions les plus conservées d'un point de vue structural sont celles qui participent à l'activation du dioxygène par le complexe hème-thiolate. Cet ensemble est composé de trois hélices parallèles (les hélices D, L et I) ainsi que de l'hélice E. De plus, afin d'assurer la stabilité du ligand cystéinate coordonnant l'hème, une structuration particulière de la boucle contenant la cystéine est observée dans toutes les structures de P450s. Cet arrangement, appelé Cys-pocket correspond à la formation de deux liaisons hydrogènes entre la cystéine et deux amides du squelette peptidique.

Les régions les plus variables, quant à elles, correspondent à celles qui forment la cavité distale au-dessus de l'hème comprenant le site actif ainsi que les canaux d'accès des substrats et du solvant, elles correspondent aux hélices B', F, G et à la boucle F-G (qui comprend les hélices F' et G' dans les protéines membranaires).

Les homologues structurales sont encore plus fortes lorsque l'on compare les P450s de mammifères (Otyepka, Skopalik et al. 2007). Les structures sont aisément superposables, avec une bonne conservation du positionnement de l'hème et de la position des canaux d'accès au site actif comme on peut le voir sur la Figure I. 12.

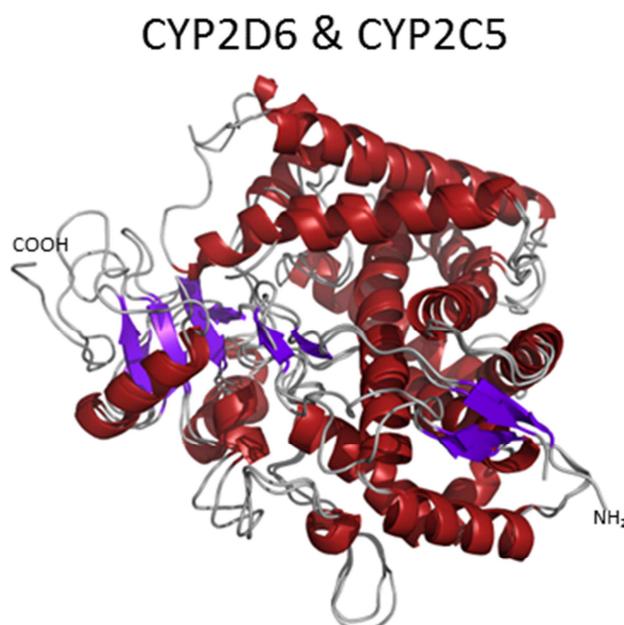


Figure I. 12: Superposition de deux structures de P450 de la famille 2, le CYP2D6 (code PDB : 2F9Q) et le CYP2C5 (code PDB : 1DT6) Les hélices sont colorées en rouge, les feuillets β en mauve, l'hème est représenté en bâtons. Le reste de la protéine est en gris. RMSD entre les deux structures 0.844Å.

1.1.3.3 Topologie du site actif

Le site actif des P450s est une cavité hydrophobe située en position distale par rapport à l'hème. Il est délimité par les hélices F, G et I, les boucles B-C, C-terminale et K-K'. Cette topologie générale présente, mis à part le positionnement de l'hélice I, des disparités selon la nature (soluble ou membranaire) du P450, illustrées sur la Figure I. 13. Ainsi, la boucle F-G des P450s solubles qui forme le toit du site actif est remplacée par les hélices F' et G' des P450s membranaires, une grande variabilité est aussi observée au niveau de la boucle B-C et de l'hélice B' et l'arrangement spatial des hélices F et G diffère selon le type de P450.

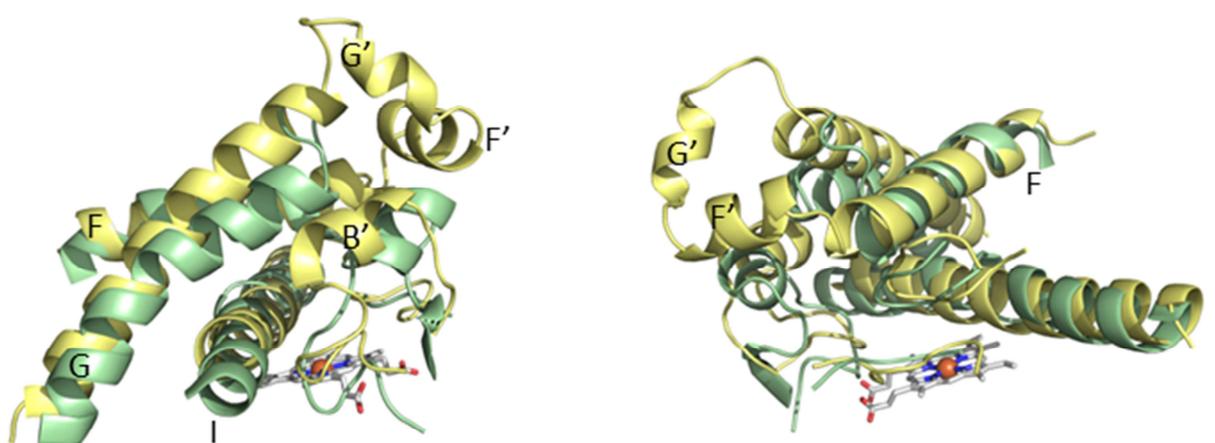


Figure I. 13: Superposition des structures secondaires bordant la cavité du P450_{CAM} bactérien (en vert, code PDB : 1AKD) et du CYP2R1 humain (en jaune, code PDB : 3CZH). L'hème est représenté en stick, le fer en sphère de Van Der Waals. Les deux vues correspondent à une rotation de 90° de la structure.

En 1992, Gotoh a publié une carte des sites de reconnaissance de substrats (SRS ou substrate Recognition Site) des P450s de mammifères de la famille 2 (Gotoh 1992). Ces données obtenues par un simple alignement manuel des séquences avec celle du P450_{CAM} ont permis de délimiter 6 domaines (notés SRS1 à SRS6), répartis sur tout le long de la séquence protéique. Ils définissent les sites de reconnaissance des substrats avec l'apoprotéine. Ces domaines forment des blocs homogènes qui présentent une forte variabilité de séquence ; cette variabilité ainsi que le positionnement des éléments structuraux du site actif peut donc expliquer la grande diversité de substrats pris en charge par les P450s.

expériences de mutagenèse (Williams, Cosme et al. 2000; Williams, Cosme et al. 2003) et des expériences de lyse trypsique (Pikuleva, Mast et al. 2008; Mast, Liao et al. 2009).

De même, l'étude par fluorescence des tryptophanes du CYP2C2 de lapin (Ozalp, Szczesna-Skorupa et al. 2006) montre que des tryptophanes de l'hélice A et du brin β 2-2 voient leur fluorescence diminuée en présence de phospholipides modifiés afin de *quencher* l'émission de rayonnements. Ces deux éléments de structure secondaire sont donc aussi potentiellement en interaction avec la membrane.

Deux autres paramètres caractérisant l'interaction protéine / membrane ont été étudiés :

- L'orientation de l'hème (et donc de la protéine) par rapport à la membrane a pu être estimée entre 50° et 70° pour les CYP17 et CYP21 en étudiant la décroissance de l'absorption anisotrope consécutive à la dissociation des complexes [Fe^{II}-CO] (Ohta, Kawato et al. 1992).
- Une étude de microscopie à force atomique a aussi permis de déterminer que le P450 affleurerait à une hauteur de 35 à 45 nm au-dessus du plan supérieur de la membrane (Bayburt and Sligar 2002).

Grâce à tous ces éléments, la position et l'orientation des P450s mammifères a pu être déterminée et la construction de modèles d'assemblage en membrane des CYP2C5 (Williams, Cosme et al. 2000), 2B4 (Zhao, White et al. 2006) et 2C9 (Berka, Hendrychova et al. 2011; Cojocar, Balali-Mood et al. 2011) a démontré l'importance de cette interaction notamment pour l'incorporation de substrats hydrophobes au site actif de l'enzyme.

1.1.3.5 Interaction avec la cytochrome P450 réductase chez les eucaryotes

❖ Structure des P450 réductases.

En parallèle à l'étude structurale des P450s, la cristallisation de son principal partenaire rédox, la P450 réductase, a fait l'objet d'efforts soutenus. En 1997, la première structure de P450 réductase (de rat) a été déposée à la PDB (Wang, Roberts et al. 1997). Aujourd'hui, on compte une vingtaine de structures déposées dont celle de la P450 réductase humaine (codes PDB : 3QE2, 2QFC et 3QFR) (Xia, Hamdane et al. 2011). Comme pour les P450s, la réductase est ancrée à la membrane par une hélice N-terminale transmembranaire ; cette partie a été tronquée afin de pouvoir produire une protéine soluble compatible avec les conditions de cristallisation. Les structures publiées ont permis de distinguer 4 éléments structuraux caractéristiques des P450 réductases : un domaine N-terminal

comprenant un cofacteur FMN, un domaine de liaison au P450, un domaine à flavine FAD et un domaine C-terminal de liaison au NADPH (voir Figure I. 16).

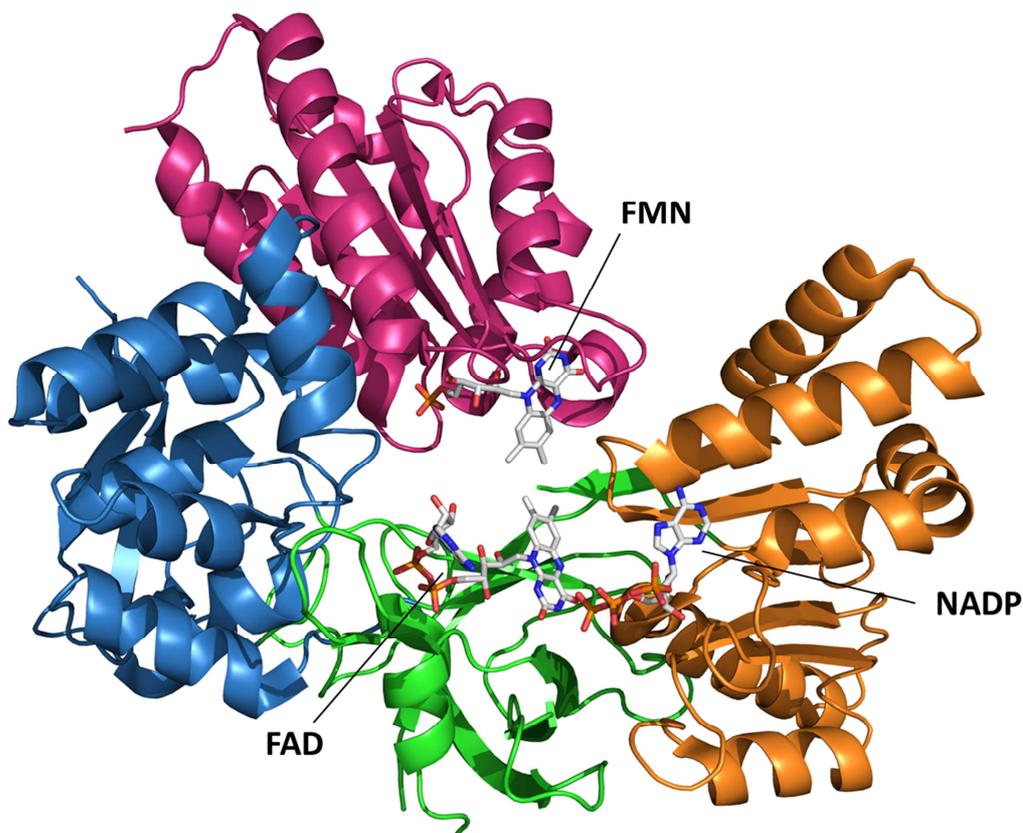


Figure I. 16 : Les quatre domaines structuraux de la P450 réductase humaine (code PDB : 3QE2, protéine tronquée de 63 résidus en partie N-terminale). La protéine est représentée en mode cartoon, les cofacteurs en bâton. Le domaine N-terminal à FMN est coloré en rose, le domaine de liaison au P450 en bleu, le domaine à flavine FAD en vert et le domaine de liaison au NADPH en orange.

❖ Interaction et transfert d'électrons au P450.

Contrairement aux P450s tronqués qui sont actifs malgré la délétion de leur hélice transmembranaire, les formes solubles de réductase de mammifère ne sont pas capables de transférer des électrons aux P450s. L'ancrage de ces enzymes à la membrane semble être nécessaire pour assurer une bonne orientation spatiale des centres rédox et ainsi assurer un transfert d'électron efficace (Gideon, Kumari et al. 2012).

L'étude de ces assemblages (P450, P450 réductase, bicouche lipidique) reste complexe et l'orientation relative de la réductase par rapport au P450 non totalement élucidée. La composition

lipidique de la membrane affecte en effet l'interaction entre P450 et réductase (Ingelman-Sundberg, Haaparanta et al. 1981; Ingelman-Sundberg, Blanck et al. 1983).

Cependant des expériences d'arrimage moléculaire (Wang, Roberts et al. 1997) et de mutagénèse dirigée (Zhao, Modi et al. 1999) ont montré que la principale zone d'interaction de la réductase avec le P450 était située au niveau du domaine à FMN via une interaction principalement électrostatique accompagnée d'une modification conformationnelle, la P450 réductase adoptant alors une conformation ouverte (Figure I. 17) propice au transfert d'électrons.

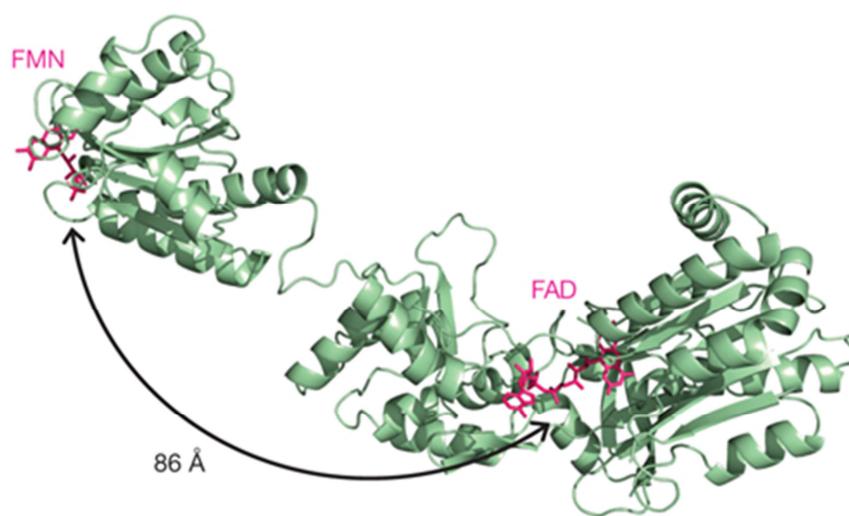


Figure I. 17 : Structure ouverte d'une P450 réductase. Protéine chimérique humaine / de levure. D'après L. Aigrain (Aigrain, Pompon et al. 2009)

1.1.3.6 Les canaux d'accès au site actif

Le site actif des P450s étant profondément enfoui au cœur de la protéine et à proximité du complexe hème-thiolate, donc complètement isolé du milieu extérieur, l'identification des chemins d'entrée et de sorties du solvant et des substrats est un enjeu crucial afin, notamment, de comprendre les spécificités de substrat observées. L'ouverture et la fermeture de canaux d'entrée de substrats ont tout d'abord été observés et caractérisés par des expériences de dynamique moléculaire sur des structures de P450 bactériens au cours desquelles la sortie sous contrainte du substrat du site actif de l'enzyme permettait de définir les canaux d'accès (Ludemann, Lounnas et al. 2000). L'étude s'est ensuite élargie aux structures de P450s de mammifères (Otyepka, Skopalik et al. 2007). Les expériences de dynamique moléculaire ont été abandonnées au profit d'algorithmes - CAVER (Petrek, Otyepka et al. 2006) puis MOLE (Petrek, Kosinova et al. 2007) - explorant les cavités de la protéine avec une sonde afin de trouver des voies d'accès au site actif (Cojocar, Winn et al. 2007; Winn,

Cojocaru et al. 2007). Une nomenclature de ces canaux d'accès, bien qu'historiquement plus adaptée aux structures bactériennes, est aujourd'hui utilisée pour caractériser les canaux d'accès au site actif aussi bien pour les P450s bactériens que pour les P450s de mammifère. Elle est présentée dans la Figure I. 18 et le Tableau I. 2.

Le canal 1 est un canal rare qui n'a été observé que sur le P450_{CAM}. Les canaux de la famille 2 sont tous localisés au voisinage de la boucle B-C et de l'hélice B'. C'est une région très variable aussi bien en termes de séquence qu'en termes de structure et qui conditionne donc la spécificité de substrat de chaque isoforme. La boucle B-C a d'ailleurs été identifiée comme l'un des six sites de reconnaissance de substrat (SRS) des P450s de la famille 2 (Gotoh 1992). Les canaux 3, 4 et 5 sont, au même titre que le canal 1, rarement observés, les canaux S et W servent quant à eux à la diffusion de l'eau du fait de leurs orientations et de leurs largeurs non compatibles avec le passage d'un substrat (Poulos, Finzel et al. 1987). Il existe cependant des exceptions puisqu'un canal S d'un rayon minimal de 2,2Å (suffisamment large pour le passage d'un substrat) a été observé sur le CYP2D6 (Rowland, Blaney et al. 2006). Il est donc possible que le canal S soit aussi une voie d'entrée des substrats au site actif de l'enzyme.

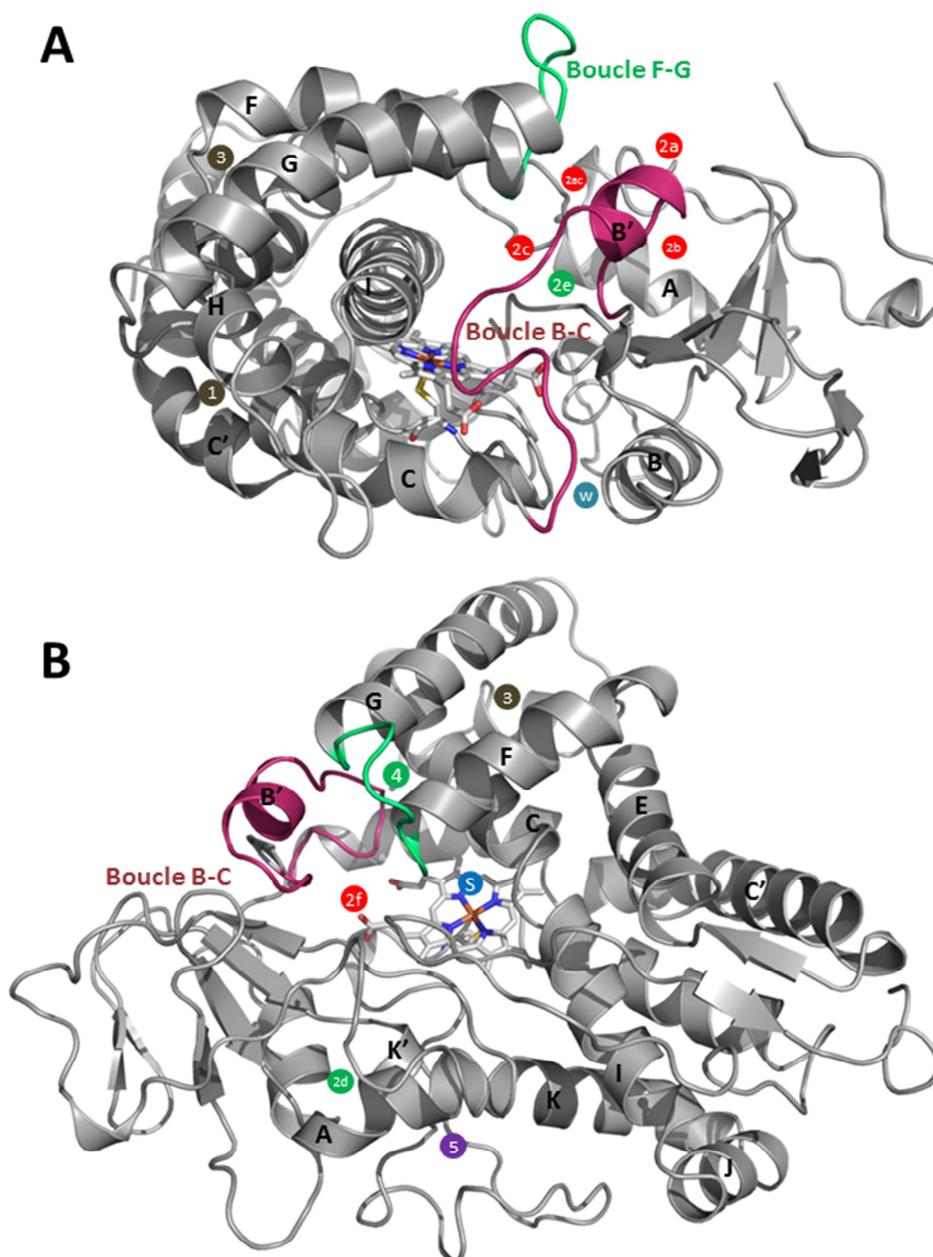


Figure I. 18 : Représentation des différents canaux d'accès des P450s (Winn, Cojocaru et al. 2007). Les différents canaux sont visualisés sur la protéine P450_{CAM} (code PDB : 1AKD). La protéine est représentée en cartoon gris, l'hème en bâtons. Les deux vues A et B (reliées par une rotation de 90°) sont nécessaires à la visualisation de tous les canaux. La boucle B-C est colorée en magenta, la boucle F-G en vert. Les ouvertures des canaux sont représentées par des cercles positionnés en surface de la protéine. Les canaux identifiés par une même couleur sont liés par (i) un même mode d'ouverture (2a, 2b, 2c, 2ac, 2f en rouge et 4, 2c, 2e en vert), (ii) leur fonction (canaux solvant-S et water-W en bleu) ou (iii) ceux identifiés plus récemment (canal 5 en violet)

canal	Localisation	Commentaire
1	entre les hélices C/C' et H ou L, proche de la boucle G-H et du feuillet β_2	Canal rare - identifié sur P450 _{CAM}
2a	entre la boucle F-G, l'hélice B', la boucle B-B' et le feuillet β_1	canal situé entre les canaux 2a et 2c
2b	entre la boucle B-B' et les feuillets β_1 et β_3	
2c	entre les hélices B', G, I et la boucle B-C	
2ac	entre l'extrémité de la boucle B-C et l'hélice G	
2e	à travers la boucle B-C	
2d	proche du canal 2a. Sortie du canal entre les hélices A et A'	
2f	proche du canal 2a. Sortie du canal entre l'hélice F et la boucle F-G	
3	entre les hélices F et G ou au niveau de la boucle E-F	canal rare
4	à travers la boucle F-G	canal rare – ex : CYP6B (Li, Baudry et al. 2004)
5	entre les hélices K et K'	canal rare – ex : CYP2A6
Solvant (S)	entre les hélices E, F, I et le feuillet β_5	entrée de la molécule d'eau entrant dans le cycle catalytique du P450
Water (w)	sortie du canal à la base de la boucle B-C à proximité de l'extrémité C-terminale de l'hélice B, canal proximal	

Tableau I. 2 : Localisation des canaux d'accès au site actif des P450s (Winn, Cojocar et al. 2007)

I.1.4 Les cytochromes P450 humains

Le séquençage du génome humain (achevé en 2003) a montré qu'il existe 57 gènes codant pour des cytochromes P450. Ces enzymes sont membranaires, certaines ancrées aux membranes du réticulum endoplasmique, d'autres aux membranes des mitochondries.

P450	Tissus d'expression principaux	Localisation cellulaire	Activité caractéristique
1A1	Poumons	RE	3-hydroxylation du benzo[α]pyrène
1A2	Foie	RE	N3-déméthylation de la caféine
1B1	Foie et reins	RE	4-hydroxylation du 17 β -estradiol
2A6	Foie et poumons	RE	7-hydroxylation de la coumarine
2A7	Peau		
2A13	Muqueuse nasale	RE	activation de la 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
2B6	Foie et poumons	RE	N-déméthylation de la (S)-mephenytoine
2C8	Foie	RE	6 α -hydroxylation du taxol
2C9	Foie	RE	4'-hydroxylation du diclofénac
2C18	Foie	RE	
2C19	Foie	RE	4'-hydroxylation de la (S)-mephenytoine
2D6	Foie	RE	4-hydroxylation de la débrisoquine
2E1	Foie et poumons	RE	6-hydroxylation de la chlozoxazone
2F1	Poumons	RE	activation du 3-méthylindole
2J2	Cœur	RE	hydroxylation de l'ébastine
2R1		RE	hydroxylation des vitamines D2 et D3
2S1	Poumons	RE	hydroxylation de l'acide trans rétinoïque
2U1	Cerveau et thymus	RE	hydroxylation d'acides gras à longue chaîne
2W1			
3A4	Foie et intestion	RE	6 β -hydroxylation de la testostérone
3A5	Foie et poumons	RE	6 β -hydroxylation de la testostérone
3A7	Foie fœtal	RE	6 β -hydroxylation de la testostérone
3A43	ARNm détecté dans les gonades	(RE)	
4A11	Foie	RE	ω -hydroxylation d'acides gras
4A22		RE	
4B1	Poumons	RE	ω -hydroxylation de l'acide laurique
4F2	Foie	RE	ω -hydroxylation du leucotriène B ₄
4F3	Neutrophiles	RE	ω -hydroxylation du leucotriène B ₄
4F8	Vésicules séminales	RE	ω -2-hydroxylation de prostaglandines
4F11	Foie	RE	
4F12	Foie	RE	ω , ω -2-hydroxylation de l'acide arachidonique
4F22			
4V2			oxydation d'acides gras
4X1	Cerveau		oxydation d'acides gras
4Z1			
5A1	Plaquettes	RE	synthèse du thromboxane A2
7A1	Foie	RE	7 α -hydroxylation du cholestérol
7B1	Cerveau	RE	7 α -hydroxylation de la déhydroepiandrosterone
8A1	Aorte	RE	synthèse de la prostacycline
8B1	Foie	RE	
11A1	Glandes adrénales	Mi	coupure de chaînes latérales du cholestérol
11B1	Glandes adrénales	Mi	11-hydroxylation du 11-desoxycortisol
11B2	Glandes adrénales	Mi	18-hydroxylation de la corticostérone
17A1	Tissus stéroïdogènes	RE	17 α -hydroxylation de stéroïdes
19A1	Tissus stéroïdogènes		
20A1			
21A2	Tissus stéroïdogènes	RE	21-hydroxylation de la 17-hydroxyprogestérone
24A1	Reins	Mi	24-hydroxylation de la 25-hydroxyvitamine D ₃
26A1		RE	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque
26B1	Cerveau	RE	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque
26C1			
27A1	Foie	Mi	27-hydroxylation de stérols
27B1	Reins	Mi	1-hydroxylation de la vitamine D ₃
27C1			
39A1	Foie	RE	7-hydroxylation du 24-hydroxycholestérol
46A1	Cerveau	RE	24-hydroxylation du cholestérol
51A1	Foie	RE	14 α -déméthylation du lanostérol

Tableau I. 3 : les 57 cytochromes P450 humains, leurs localisations et leurs activités caractéristiques (activités historiques qui ont permis de détecter le P450). RE : Reticulum endoplasmique, Mi : Mitochondrie, d'après (Guengerich, 2005)

Parmi ces 57 P450s humains, quinze environ sont connus pour être impliqués dans la phase I du métabolisme des xénobiotiques (voir Tableau I. 4). Ils participent ainsi à l'élimination des composés exogènes comme les médicaments, les toxines ou les polluants. On dénombre aussi environ 20 P450s impliqués dans la biosynthèse et la dégradation des stérols, vitamines et eïcosanoïdes. Parmi les P450s dont le rôle biologique est encore incertain ou inconnu, on peut distinguer ceux qui semblent être impliqués dans la dégradation des eïcosanoïdes ou dans la mono-oxygénation des acides gras. Enfin les 15 P450s dont l'existence est connue depuis le séquençage du génome humain mais dont l'étude du rôle biologique est incomplète ou inexistante sont appelés « P450s orphelins ».

Métabolisation des xénobiotiques	Rôle endogène			Rôle biologique incertain ou inconnu		
	Stérols	Eïcosanoïdes	Vitamines	Acides gras	Eïcosanoïdes	Orphelins
1A1	1B1	5A1	24A1	2J2	4F2	2A7
1A2	7A1	8A1	26A1	4A11	4F3	2R1
2A6	7B1		26B1	4B1	4F8	2S1
2B6	8B1		27B1	4F12		2U1
2C8	11A1					2W1
2C9	11B1					3A43
2C18	11B2					4A22
2C19	17A1					4F11
2D6	19A1					4F22
2E1	21A2					4V2
2F1	27A1					4X1
3A4	39A1					20A1
3A5	46A1					26C1
3A7	51A1					27C1

Tableau I. 4 : Classification des P450s humains basée sur leur principal substrat (Guengerich, Wu et al. 2005) Cette classification est arbitraire, certains P450s pouvant être rangés dans plusieurs colonnes (CYP3A4 par exemple).

I.1.5 Les cytochromes P450 du cerveau

Le taux d'expression de P450 dans le cerveau a été pour la première fois évalué chez le rat à environ 30 pmol/mg de protéine ce qui correspond à 3% du niveau atteint dans le foie (Sasame, Ames et al. 1977). Chez l'homme, selon les auteurs, ces mêmes taux correspondraient à 1 à 10 % de ceux relevés au niveau hépatique. Toutefois, ces résultats ne prennent pas en compte une distribution non uniforme des P450s au sein de l'organe. En effet, la quantité et la nature des P450s diffèrent selon la région de cerveau considérée (voir Tableau I. 5).

Par exemple la proportion de P450s présents dans le cervelet est la plus élevée (Warner, Kohler et al. 1988). Il existe aussi quelques P450s exprimés de façon prédominante dans le cerveau : le CYP26B1 présent dans le cervelet et le pont de Varole, ou le CYP46A1 présent dans l'ensemble de l'organe, en sont des exemples. Ces enzymes exprimées spécifiquement dans le cerveau ne sont pas impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques mais possèdent des fonctions endogènes majeures comme la régulation de la biosynthèse du cholestérol ou le métabolisme de la vitamine A (Karlgrén, Miura et al. 2005).

Plus récemment, des techniques plus sensibles que le Western Blot, comme la RT-PCR, le Northern Blot ou l'hybridation *in situ*, ont permis de détecter d'autres P450s dans le cerveau : ainsi, des P450s de la famille 4 ont été identifiés dans le cortex, le cervelet et le tronc cérébral (Bylund, Zhang et al. 2002). A l'heure actuelle, on ne connaît pas de fonction physiologique ni d'activité enzymatique précise pour ces P450s.

Le fait que le taux de certains P450s dans le cerveau soit faible ne signifie pas qu'ils n'aient pas une importance capitale dans certaines fonctions physiologiques. Ainsi le CYP19, également appelé aromatasase, catalyse la conversion d'androgènes en œstrogènes dans une zone très particulière du cerveau et joue un rôle physiologique capital (Roselli, Liu et al. 2009).

	Cortex	Cervelet	Ganglions de la base	Hippocampe	Substance noire	Bulbe rachidien	Pont de Varole
CYP1A1	+	+	+	+	+	-	+
CYA1A2	+	+	+	ND	+	-	+
CYP1B1	+	+	+	+	+	+	-
CYP2C8	+	+	+	ND	ND	-	-
CYP2D6	+	+	+	+	+	-	+
CYP2E1	+	+	+	+	+	+	+
CYP2U1	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
CYP3A4	+	-	+	ND	ND	-	-
CYP3A5	+	-	+	ND	ND	-	-
CYP26B1	+	+	-	ND	ND	+	+
CYP46A1	+	-	+	+	+	-	ND

Tableau I. 5 : Présence des ARNm de quelques P450s dans différentes régions du cerveau humain (Dutheil, Beaune et al. 2008) ND : non déterminé

I.2 Les cytochromes P450 orphelins chez l'homme

I.2.1 Déorphelinisation en cours

Lors de la publication de la liste des P450s humains orphelins en 2005 (voir Tableau I. 4), on ne connaissait que très peu de chose sur ces protéines. Souvent, seule l'existence du gène était connue. Depuis, de nombreuses équipes se sont penchées sur le rôle biologique de cette quinzaine d'isoformes. Sont regroupées, ci-dessous, les principales découvertes faites pour chaque P450 orphelin ces dernières années:

CYP2A7 : Très proche du CYP2A6 avec 96% d'identité de séquence nucléotidique, l'expression de cet isoforme a été étudiée ainsi que le polymorphisme génétique qui lui est associé. Il existe aussi sous la forme d'un variant d'épissage présent dans les fibroblastes de peau. Aucun substrat n'est encore connu. (Ding, Lake et al. 1995; Fukami, Nakajima et al. 2006).

CYP2R1 : Le rôle biologique du CYP2R1 a été élucidé en 2004 avec la découverte de sa capacité à hydroxyler en position 25, les deux formes de la vitamine D : les vitamines D2 et D3 (Cheng, Motola et al. 2003). Cristallisé en complexe avec les vitamines D3 puis D2, sa structure tridimensionnelle est déposée à la PDB depuis février 2008 (Strushkevich, Usanov et al. 2008).

CYP2S1 : Cette isoforme est fortement exprimée dans des tissus extrahépatiques (trachée, poumons, estomac, intestin grêle, rate,...) (Rylander, Neve et al. 2001). L'expression du CYP2S1 chez l'homme est inductible par un certain nombre de molécules cancérigènes telles que la dioxine (Rivera, Saarikoski et al. 2002) et par les UV (Smith, Wolf et al. 2003). Enfin, deux activités enzymatiques ont été découvertes : le CYP2S1 catalyse l'hydroxylation de l'acide trans rétinolique (Smith, Wolf et al. 2003) et, surexprimé dans la levure, il transforme le naphthalène en deux métabolites non identifiés à ce jour (Karlgrén, Miura et al. 2005).

CYP2U1 : détaillé infra (paragraphe I.3)

CYP2W1 : La recherche par Northern Blot du CYP2W1 dans différents tissus est longtemps restée infructueuse, les taux d'ARNm détectés étant très bas et la protéine non détectable en Western Blot (Karlgrén, Miura et al. 2005). L'expression de cette enzyme a ensuite été établie et ce, à de hauts niveaux d'expression, dans certaines tumeurs (Karlgrén, Gomez et al. 2006; Gomez, Nekvindova et al. 2010). Surexprimé dans *E. coli*, le CYP2W1 montre une activité hydroxylase sur l'indole, la benzphétamine, le 3-méthylindole et la chlorzoxazone (5-chloro-3H-benzoxazol-2-one). (Wu, Sohl et al. 2006; Yoshioka, Kasai et al. 2006). D'un point de vue structural, bien que cette isoforme n'ait pas été cristallisée, la topologie du site actif a été déterminée avec la construction d'un modèle par homologie (Li, Tang et al. 2009).

CYP3A43 : Quatrième membre de la sous-famille 3A, le CYP3A43 possède de 71 à 76% d'identité de séquence avec les autres CYP3A. Bien que détecté dans le foie, les reins, le pancréas et la prostate, les taux d'expression du CYP3A43 sont très faibles (moins de 0.1% des taux observés pour le CYP3A4). Au contraire, dans le cerveau, son taux d'expression est 10 fois supérieur à celui du CYP3A4. La protéine recombinante métabolise aussi l'alprazolam (Agarwal, Kommaddi et al. 2008) ainsi que la testostérone (Domanski, Finta et al. 2001). Son orthologue chez le macaque a été surexprimé dans *E. coli* et présente une activité d'hydroxylation du midazolam en position 1 (Uno, Matsuno et al. 2009).

CYP4A22 : On connaît très peu de chose sur cette isoforme. Longtemps confondu avec le CYP4A11 avec lequel il partage 95% d'identité de séquence, il est plus faiblement exprimé que celui-ci aussi bien dans le foie que dans les reins (Bellamine, Wang et al. 2003). Le polymorphisme génétique a été étudié sur différentes populations montrant que cette protéine est faiblement conservée avec plus de cinq allèles différents du gène découverts (Hiratsuka, Nozawa et al. 2006; Lino Cardenas,

Renault et al. 2011). D'autre part, un modèle structural a permis de déterminer la topologie du site actif et les voies d'accès à celui-ci (Gajendrarao, Krishnamoorthy et al. 2010).

CYP4F11 : Détecté dans les principaux organes de métabolisation (foie, reins, cœur, muscles), il est très proche des autres représentants de sa sous-famille avec de 79 à 82% d'identité de séquence (Cui, Nelson et al. 2000). Suite à son expression hétérologue dans *E. coli*, une série de substrats a été découverte : le CYP4F11 catalyse l' ω -hydroxylation d'un grand nombre d'acides gras (Tang, Salamanca-Pinzon et al. 2010).

CYP4F22 : Une mutation sur le gène CYP4F22 semble être en relation avec l'apparition d'une maladie génétique affectant la peau, l'ichtyose lamellaire (Rodriguez-Pazos, Ginarte et al. 2011). Exprimé dans la levure *S. cerevisiae*, le CYP4F22 catalyse l'hydroxylation d'acides gras tels que l'acide arachidonique (Nilsson, Ivanov et al. 2010).

CYP4V2 : Une mutation sur le gène CYP4V2 est en relation avec l'apparition d'une maladie oculaire génétique, la dystrophie cristalline de Bietti (Li, Jiao et al. 2004). Comme pour le CYP4F22 et l'ichtyose lamellaire, cette maladie est associée à un dérèglement des voies de biosynthèse des acides gras et il a été démontré que le CYP4V2 peut catalyser l'hydroxylation en bout de chaîne d'acides gras saturés (Nakano, Kelly et al. 2009; Mackay and Halford 2011). Un modèle de cette isoforme construit par homologie donne une cartographie du site actif et des expériences d'arrimage moléculaire (docking) ont permis d'identifier les relations structure/activité au sein du site actif (Kumar 2011)

CYP4X1 : Initialement, on pensait que cette isoforme était présente uniquement dans certaines parties du cerveau (cortex, hippocampe, cervelet) (Bylund, Zhang et al. 2002). Chez la souris, c'est même le principal P450 exprimé dans le cerveau (Al-Anizy, Horley et al. 2006). Il a ensuite été détecté dans le cœur, la prostate, le foie, ainsi que dans les seins. Les premières activités ont été découvertes : la protéine humaine exprimée dans *E. coli* présente une activité catalytique d'hydroxylation sur l'anandamide et sur des acides gras (Stark, Dostalek et al. 2008).

CYP20A1 : La seule information connue à ce jour pour le CYP20A1 est la distribution de son ARNm dans les tissus : il est localisé préférentiellement dans la substance noire, l'hippocampe et les amygdales mais aussi et ce dans une moindre mesure, dans le reste du cerveau et le foie (Stark, Wu et al. 2008). Il a été exprimé dans *E. coli* mais aucune activité enzymatique n'a encore été détectée pour cette isoforme (Stark, Wu et al. 2008).

CYP26C1 : Cette isoforme métabolise les acides rétinoïques impliqués dans la morphogénèse et la différenciation cellulaire (Taimi, Helvig et al. 2004). Il existe un polymorphisme génétique associé à

cette enzyme et la protéine, lorsqu'elle est exprimée sous une forme inactive, est associée à une malformation congénitale : la spina bifida (Rat, Billaut-Laden et al. 2006).

CYP27C1 : l'ARNm du CYP27C1 a été retrouvé dans le foie, les reins, le pancréas et quelques autres tissus et la protéine a été exprimée dans *E. coli* (Wu, Bartleson et al. 2006) mais aucun substrat n'a encore été découvert.

Ainsi, en dix ans, quasiment tous les P450s orphelins ont été exprimés dans des systèmes hétérologues. Pour une grande partie d'entre eux, quelques substrats ont été découverts et des études structurales par modélisation ou cristallographie ont parfois été menées.

1.2.2 Stratégies de « déorphelinisation »

Afin de trouver les premiers substrats d'un P450 orphelin, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. On distingue généralement deux catégories. Soit on cherche un substrat parmi une liste de substrats potentiels préalablement établie, on parle alors de stratégie dirigée, soit on s'affranchit de tous biais en recherchant un substrat en aveugle. L'hypothèse de travail dans ce dernier cas est que les substrats sont présents dans les tissus dans lesquels le P450 est exprimé. Des extraits de tissus sont donc utilisés comme source de substrats (Guengerich, Tang et al. 2011).

1.2.2.1 Stratégies dirigées

Une première approche consiste à **comparer les séquences primaires** afin de définir la fonction biologique d'un P450 orphelin. Ainsi, si l'identité de séquence entre deux P450s est très forte, on peut estimer qu'il y aura une similarité pour leurs activités catalytiques.

Une autre approche utilise **les outils de la biologie structurale**. Avec l'élucidation de la structure tridimensionnelle du P450 (par cristallographie ou modélisation), il est possible de prédire les substrats grâce à des expériences d'arrimage moléculaire (docking). Cependant il existe deux limitations à cette approche. Premièrement, sur la plupart des structures, il existe de grandes différences entre les structures de P450s cristallisés avec leur substrat et celles sans substrat (Ortiz de Montellano 2005). D'autre part, de nombreux P450s ont un site de liaison aux substrats très volumineux et donc compatible avec un trop grand nombre de substrats potentiels (Yano, Wester et al. 2004). Même sur des structures cristallographiques la liaison du substrat à la protéine n'est pas toujours optimale. Par exemple, la progestérone cristallisée dans le site actif du CYP3A4 présente une conformation non

compatible avec la réactivité observée car trop éloignée de l'hème (Williams, Cosme et al. 2004). On suppose donc qu'il existe plusieurs positions pour cette molécule au sein du site actif, l'une d'entre elles étant compatible avec la réactivité observée.

Une autre méthode consiste à chercher un substrat parmi les **substrats d'autres P450s de la même famille**. Ainsi, lorsque le CYP27C1 a été isolé et exprimé dans *E. coli* (Wu, Bartleson et al. 2006), il semblait logique de tester comme substrat la vitamine D3 et le cholestérol qui sont métabolisés par les CYP27A1 et 27B1 (Ortiz de Montellano 2005).

Une dernière approche consiste à **tester une petite librairie de molécules** comme substrats potentiels. Cette méthodologie s'est avérée concluante pour le CYP2W1 dont on savait qu'il était fortement exprimé dans certaines tumeurs. Un screening de molécules pro carcinogènes a révélé une activité du CYP2W1 sur la benzphetamine (Wu, Sohl et al. 2006).

1.2.2.2 Stratégie en aveugle

La difficulté des stratégies non dirigées est de pouvoir isoler le métabolite des extraits de tissus ou fluides corporels utilisés comme sources de substrat.

Une solution, développée par F.P. Guengerich, consiste à **incuber en utilisant un mélange équimolaire $^{18}\text{O}_2/^{16}\text{O}_2$** comme source d'oxygène. 50% des métabolites formés auront alors incorporé un oxygène 18, 50% un oxygène 16. En spectrométrie de masse, les métabolites sont facilement détectés car caractérisés par un doublet d'ion de masse (M/M+2) et de même intensité (Sanchez-Ponce and Guengerich 2007). Cette méthode a d'abord été validée sur des P450s dont les activités étaient connues (CYP1A2, 2C8 et 2C9) (Guengerich, Tang et al. 2011) puis appliquée à la déorphélinisation du CYP4F11 pour lequel des activités sur des acides gras ont été découvertes (Tang, Salamanca-Pinzon et al. 2010).

Une seconde approche passerait par l'**immobilisation du P450 sur des billes de sépharose**. Après incubation dans des extraits de tissus, les billes seraient lavées et les éventuels ligands extraits et caractérisés. Cette méthode permettrait de définir des ligands du P450 (qui peuvent être substrats ou bien inhibiteurs). Elle a permis d'identifier le premier ligand du récepteur nucléaire hépatique 4α (Yuan, Ta et al. 2009) mais n'est pas encore utilisée pour la déorphélinisation de P450s.

I.3 Le cytochrome P450 2U1

I.3.1 Caractérisation génétique

Le gène codant pour le CYP2U1 est situé sur le quatrième chromosome (4q25). Chez l'homme, il est long de 18kb pour une séquence protéique de 544 acides aminés.

I.3.1.1 Le CYP2U1 au sein de la famille 2

Le CYP2U1 fait partie de la famille 2 qui, chez l'homme, avec 16 isoformes, est la plus représentée des familles de P450s. Toutefois, cette information ne permet pas de préjuger du rôle du CYP2U1. En effet, au sein de cette même famille, certaines isoformes sont majoritairement impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques (CYP2D6, CYP2C9,...) d'autres agissent principalement sur des voies de synthèse d'endogènes (CYP2J2,...).

Ce qui différencie le CYP2U1 des autres P450s de sa famille est tout d'abord sa taille. Avec une séquence protéique de 544 acides aminés, le CYP2U1 est 10% plus long que les autres isoformes (Figure I. 19). Ce supplément d'une quarantaine d'acides aminés devrait se traduire par une structure tridimensionnelle différente de celle habituellement retrouvée pour les P450s de cette famille et nous fera nous interroger sur son rôle.

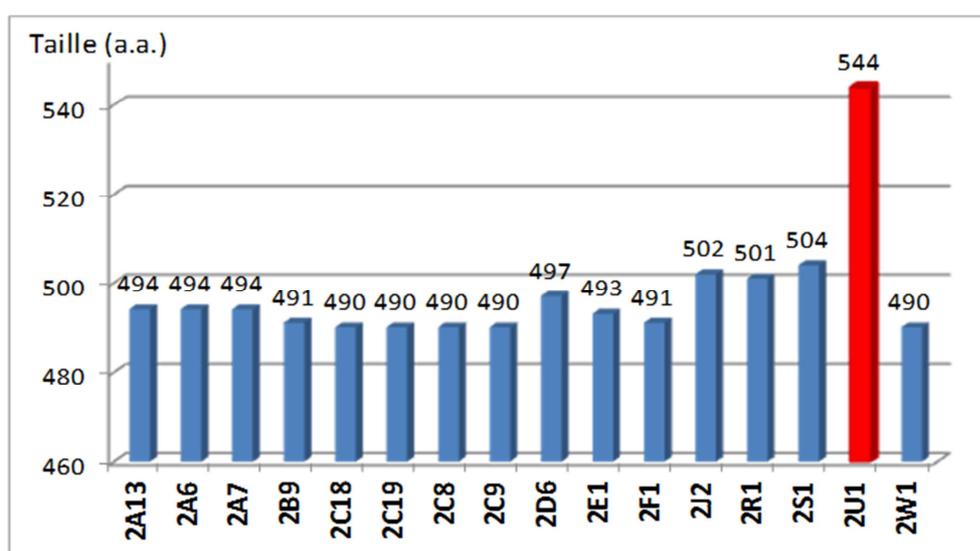


Figure I. 19 : Taille (en acides aminés) de toutes les isoformes de la famille 2 chez l'homme

D'un point de vue phylogénétique, l'arbre des familles 1 et 2 des P450s humains (Figure I. 20) montre que le CYP2U1 est la première isoforme à diverger de la famille 2. Cette position du CYP2U1

signifie que ce gène a soit divergé très tôt au cours de l'évolution, soit il a muté plus rapidement que le reste de la famille 2.

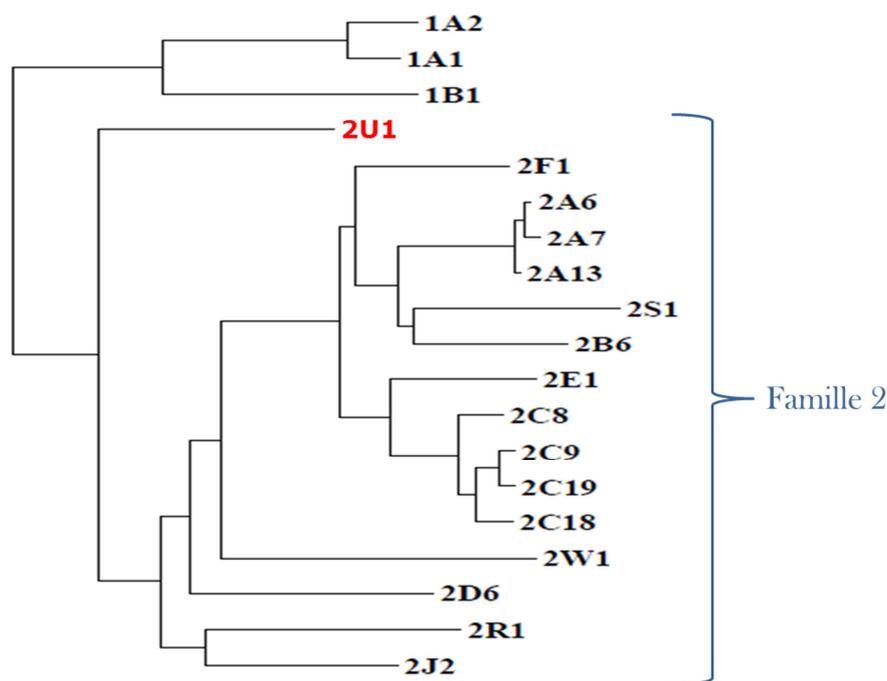


Figure I. 20 : Arbre phylogénétique des familles de CYP1 & 2 (sur les séquences totales) obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance (PhyML-model LG). Alignement avec MUSCLE (Edgar 2004)

Un blast de la séquence protéique du CYP2U1 sur les P450 humains montre qu'il présente la plus forte homologie avec les CYP2R1 (42% d'identité de séquence), 2D6 (41% d'identité de séquence) et 2J2 (39% d'identité de séquence).

1.3.1.2 Une structure intron/exon atypique

Le gène du CYP2U1, comme celui du CYP2R1, possède comme particularité d'être composé de cinq exons alors que les autres isoformes de la famille 2 ont tous un gène structuré en 9 exons. Les CYP2U1 et 2R1 possèdent les introns équivalents aux introns 2,6 et 8 des autres gènes de CYP2, qui devaient donc déjà être présents sur le gène ancestral commun aux enzymes de cette famille. A partir de ce gène ancestral, les CYP2U1 et 2R1 ont alors acquis indépendamment un nouvel intron. En ce qui concerne le CYP2U1, l'apparition de l'intron 2 est liée à la présence d'un site d'épissage GC qui lui est spécifique (Nelson, Zeldin et al. 2004).

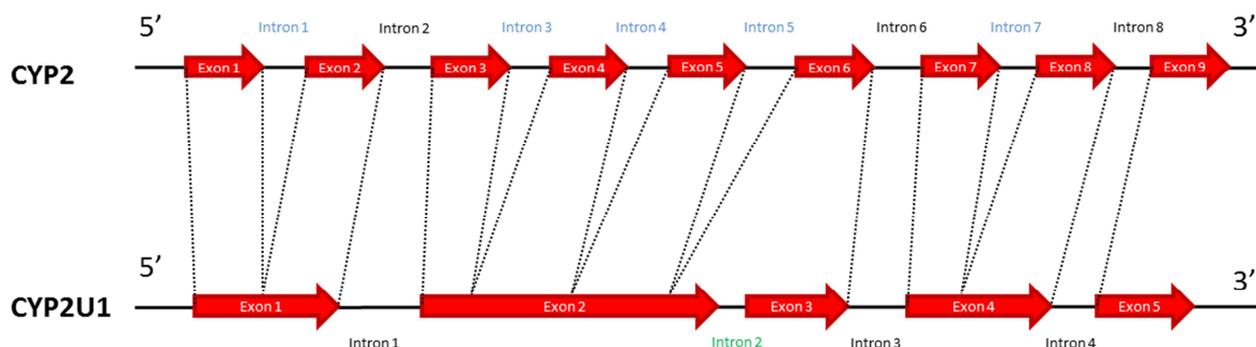


Figure I. 21 : Représentation schématique de la structure intron/exon habituelle des gènes de la famille 2 et du CYP2U1.

Les CYP2U1 et 2R1 diffèrent donc des autres isoformes de cette famille avec une structure intron/exon différente. Toutefois, les arbres phylogénétiques les donnent toujours comme appartenant à cette famille 2.

1.3.1.3 Un faible polymorphisme du gène humain

Une étude du polymorphisme du gène du CYP2U1 chez l'homme a permis d'identifier les mutations du gène sur une cohorte de 80 volontaires (Devos, Lino Cardenas et al. 2010). Quatre polymorphismes ont été identifiés. Ils correspondent aux mutations -204C > A et -241T > C dans la région flanquante en 5' ; -37G > A dans la région non transcrite en 5' et IVS2-17T > C dans l'intron 2. Aucune mutation n'a été observée sur les exons de la protéine et les mutations les plus fréquentes, -241T > C (présente chez 59.7% des individus de l'étude) et IVS2-17T > C (66.0%) n'altèrent pas l'expression du CYP2U1 qui a été évaluée dans les poumons. Ces résultats confirment donc un probable rôle endogène du CYP2U1.

1.3.1.4 Le CYP2U1, seul représentant de la sous-famille 2U

Sa séquence de 544 acides aminés présente une forte conservation inter-espèce allant de 56 à 99% d'identité de séquence avec les CYP2U1 de poisson zèbre et de chimpanzé respectivement (Tableau I. 6). D'autre part, contrairement à la plupart des sous-familles pour lesquelles il existe plusieurs isoformes (par exemple, il existe 30 isoformes différentes de la sous-famille 2J allant du CYP2J1 de lapin au CYP2J30 du poisson zèbre), il n'a, à ce jour, été trouvé aucun gène orthologue au CYP2U1. Il n'existe donc pas de CYP2U2.

Espèce	Pourcentage d'identité avec l'isoforme humaine
Pan troglodytes (chimpanzé)	99
Canis lupus familiaris (chien)	88
Equus caballus (cheval)	87
Mus musculus (souris)	83
Taeniopygia guttata (mandarin - oiseau)	67
Xenopus tropicalis (xénope - bactracien)	64
Gasterosteus aculeatus (epinoche - poisson)	58
Danio rerio (poisson zèbre)	56

Tableau I. 6 : Pourcentage d'identité protéique des CYP2U1 de différentes espèces avec l'isoforme humaine. Pourcentage obtenu par Blast-P.

I.3.2 Répartition dans les tissus

Contrairement aux P450s impliqués dans le métabolisme de xénobiotiques qui sont retrouvés dans les principaux organes du métabolisme (foie, poumon,...) le CYP2U1 présente une distribution spécifique tissulaire.

Une étude de la distribution des ARNm du CYP2U1 (Chuang, Helvig et al. 2004) a montré que celui-ci s'exprimait préférentiellement dans le thymus et le cervelet ainsi que, dans une moindre mesure, dans le cœur et les reins (Figure I. 22)

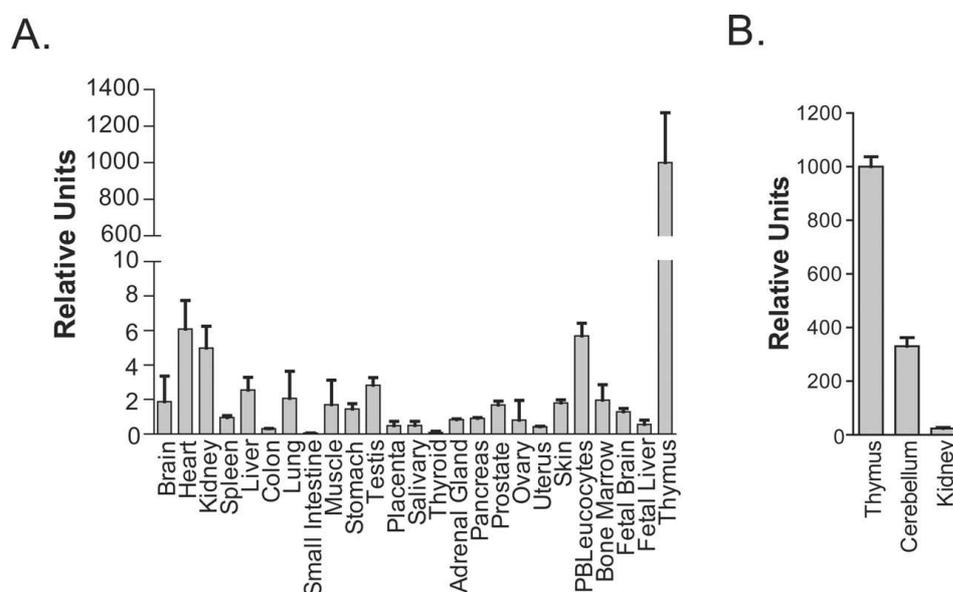


Figure I. 22 : distribution des ARNm du CYP2U1 selon les tissus déterminée par RT-PCR. Le niveau d'expression dans le thymus (1000) sert de référence pour les autres tissus. (Chuang, Helvig et al. 2004)

De même, deux études par Western Blot de la distribution du CYP2U1 dans l'organisme (Karlgren, Backlund et al. 2004; Dutheil, Dauchy et al. 2009) a confirmé que cette protéine était exprimée dans les cerveaux humains et de rat et ce, dans des proportions variées selon la région considérée (Figure I. 23).

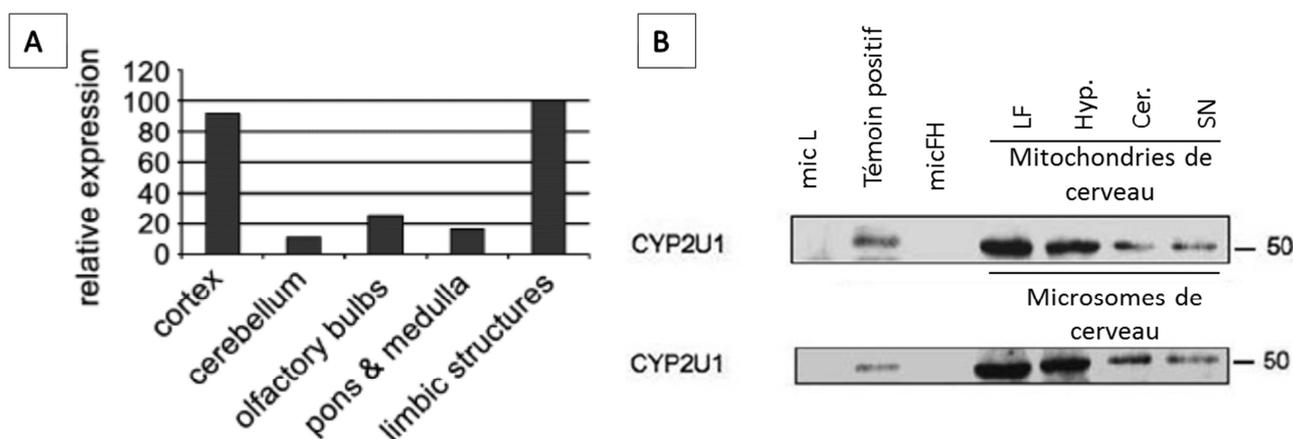


Figure I. 23 : Caractérisation biochimique et expression du CYP2U1 dans différentes régions du cerveau. A : expression dans le cerveau de rat (Karlgren, Backlund et al. 2004). B : Analyse Western Blot du CYP2U1 dans différentes régions du cerveau humain (Dutheil, Beaune et al. 2008) (micL : microsomes de levure, micFH : microsomes de foie humain, LF : lobe frontal, Hyp : hypophyse, Cer : cervelet, SN : substance noire)

I.3.3 Caractérisation biologique

Le rôle biologique du CYP2U1 n'est pas connu à ce jour. Il semble qu'il puisse catalyser l'hydroxylation en ω et $\omega-1$ de certains acides gras (Chuang, Helvig et al. 2004). Toutefois, aucune mesure de constante de vitesse ou de constante d'affinité n'a été effectuée pour ces activités enzymatiques.

I.3.4 CYP2U1 et cancer

Récemment, deux études d'immunohistochimie ont montré l'implication du CYP2U1 dans le cancer du sein (Murray, Patimalla et al. 2010) ainsi que le cancer colorectal (Kumarakulasingham, Rooney et al. 2005).

Dans les deux cas, le CYP2U1 est présent en plus grandes quantités dans le tissu malade que dans le tissu sain et il a été démontré que la quantité de CYP2U1 détectée est corrélée avec le stade d'évolution de la tumeur ($\chi^2=11.83$, $P=0.02$ pour le cancer du sein et $\chi^2=14.8$, $P=0.02$ pour le cancer

colorectal). Bien que les raisons de cette surexpression dans ces tissus cancéreux soient loin d'être comprises à ce jour, le CYP2U1 pourrait être utilisé comme un biomarqueur de ces pathologies.

I.4 Objectifs de la thèse

Peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur le CYP2U1 si on le compare à d'autres isoformes humaines tels que les CYP3A4, CYP2D6 ou CYP2C8 pour lesquels des études poussées ont permis de déterminer quels étaient leurs substrats, leurs inhibiteurs et pour lesquels des structures cristallographiques sont publiées.

Le rôle biologique du CYP2U1 reste mal défini même s'il semble qu'il puisse être impliqué dans le métabolisme des acides gras tels que l'acide arachidonique qui est d'ailleurs son seul substrat connu aujourd'hui. De plus, on ne dispose d'aucune donnée structurale sur cette enzyme.

L'objectif de cette thèse sera tout d'abord de déterminer la topologie du site actif du CYP2U1 et d'essayer de comprendre ses singularités structurales entre autre pour savoir quel type de molécule endogène ou exogène est capable d'être reconnue par le CYP2U1.

Ensuite il nous faudra produire le CYP2U1 dans un système hétérologue. Cette production devra se faire en prenant en compte deux contraintes : la nécessité d'obtenir des quantités de CYP2U1 suffisantes afin de mener des tests d'activité (de l'ordre de la nano mole) ainsi que l'obligation de produire une enzyme active.

Lors d'une troisième étape, nous chercherons à identifier une ou des activités catalytiques pour ce P450. La mise au point d'un test d'activité sensible devrait permettre par la suite de cribler, en tant qu'inhibiteur de l'activité en question, d'autres molécules comme substrats potentiels du CYP2U1. Pour ce faire, nous testerons l'activité du CYP2U1 vis-à-vis de molécules exogènes connues pour être substrats de P450s de la même famille 2. Cette recherche de substrat(s) se fera en comparant les activités obtenues pour le CYP2U1 avec celles d'autres P450s présents dans le cerveau (CYP2J2 et 2D6 en particulier).

CHAPITRE II.

LE CYP2U1, UNE STRUCTURE SINGULIERE

Notre premier objectif est de construire par homologie un modèle structural du CYP2U1. Pour ce faire, il est nécessaire d'abord de procéder à un alignement des séquences protéiques de P450s dont on connaît la structure (appelés *templates*) avec celle du CYP2U1.

II.1 Alignements multiples de séquences

II.1.1 Alignement des séquences de P450s de la famille 2

La famille 2 des P450s est celle qui a été la plus étudiée d'un point de vue structural (on compte déjà 10 P450s différents de cette famille cristallisés chez l'homme). Pour l'étude du CYP2U1, il est logique de se limiter à ces structures pour le choix de modèles. Toutefois, le fait que le CYP2U1 soit plus long que toutes les autres isoformes (cf. p. 44) laisse entrevoir un problème : une partie de la séquence du CYP2U1 risque de ne pas s'aligner et un ou plusieurs inserts peuvent apparaître dans l'alignement.

L'alignement des 16 séquences de P450s humains de la famille 2 (voir Figure II. 1) fait apparaître deux zones pour lesquelles la séquence du CYP2U1 ne s'aligne pas avec les autres séquences. Ces deux domaines correspondent à des insertions et sont tous deux situés au niveau N-terminal. Le premier insert, noté insert 1, est long d'une quinzaine d'acides aminés et est situé en amont de l'hélice transmembranaire. Le second insert ou insert 2, long de 30 acides aminés est situé entre les hélices A' et A. Curieusement, ce dernier possède une succession de résidus chargés positivement (dont 3 arginines successives).

Le reste des séquences protéiques (partie C-terminale) s'aligne en blocs homogènes jusqu'à l'extrémité C-terminale (alignement complet disponible en annexe p. 173).

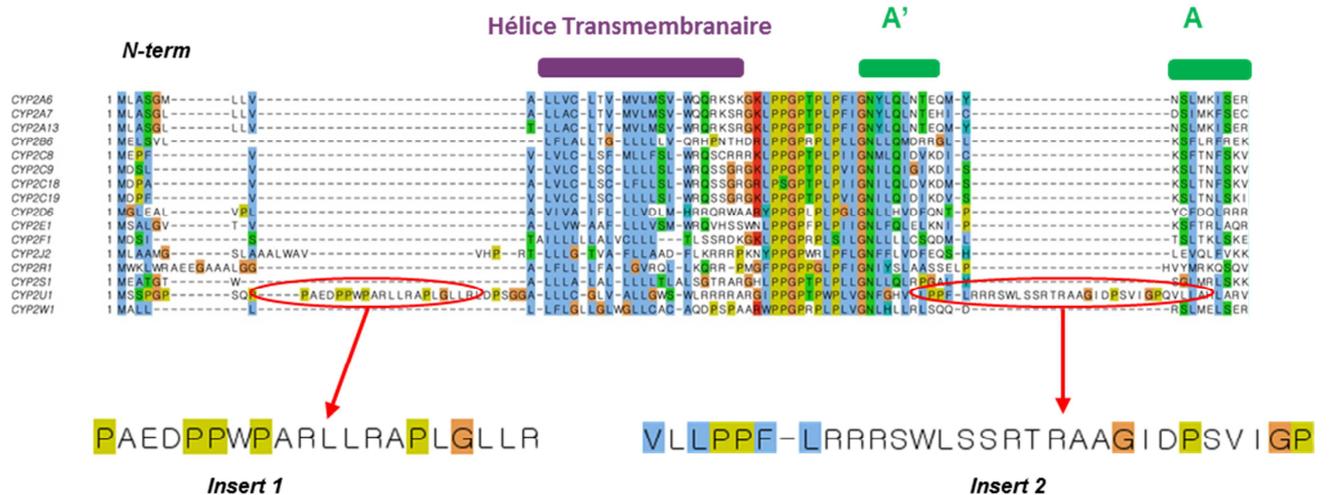


Figure II. 1 : alignement des séquences N-terminales des P450s humains de la famille 2. Alignement T-Coffee effectué sous Jalview, les résidus sont colorés en fonction de leurs propriétés physiques (polaires, apolaires,...) s'ils sont conservés au sein de l'alignement (coloration Clustalx)

II.1.2 Deux inserts spécifiques du CYP2U1

II.1.2.1 Recherche de séquences homologues aux inserts

La présence de deux inserts dans la séquence est un obstacle à la modélisation par homologie. En effet, ceux-ci ne peuvent pas être reconstruits en l'absence d'homologie. Une recherche de similarité des deux inserts sur les bases de données (recherches PSI-BLAST sur PDB, Uniprot,...) s'est avérée infructueuse. Aucun autre P450 ni même aucune autre protéine de séquence connue ne présente une quelconque homologie de séquence avec les inserts du CYP2U1. Une modélisation *de novo* de ces inserts est donc la seule option envisageable.

II.1.2.2 Des inserts en grande partie non structurés

Afin de mieux cerner la topologie des deux inserts, une prédiction de structure secondaire a été effectuée. Les résultats ont été obtenus avec deux serveurs : le serveur PSI Pred (Jones 1999) et le serveur JPred v3 de l'université de Dundee (Cole, Barber et al. 2008). Ces deux programmes basent leurs prévisions sur un PSI-Blast de la séquence cible contre les protéines déposées à la PDB et prédisent une structuration secondaire similaire du domaine N-terminal du CYP2U1. L'insert 1 pourrait se structurer en partie en hélice alpha en amont du segment transmembranaire alors que l'insert 2 ne semble pas se structurer ni en hélice ni en feuillet (voir Figure II. 2).

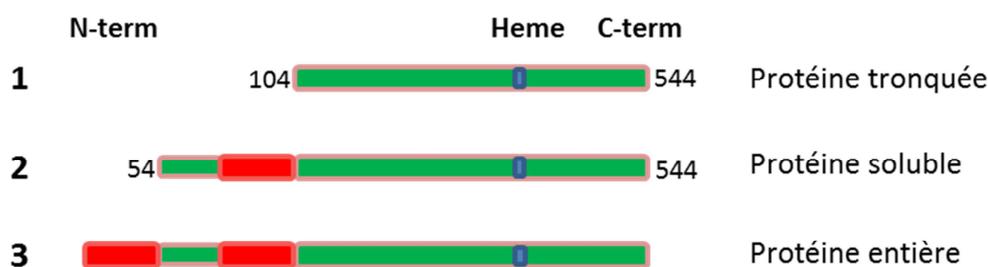


Figure II. 3 : Représentation schématique des 3 modèles construits de CYP2U1. Les domaines modélisables par homologie sont représentés en vert, les autres en rouge.

L'étude de deux modèles tronqués permet de s'affranchir (en totalité ou en partie) de la modélisation *de novo* des inserts du CYP2U1. De plus, les domaines structuraux qui constituent le site actif des P450s sont situés dans la partie C-terminale de l'enzyme et il a été prouvé qu'un P450 sans domaine N-terminal conservait son activité catalytique (voir I.1.3, p. 28). Les modèles 1 et 2 seront donc adaptés à l'étude de la topologie du site actif et à des expériences d'arrimage moléculaire (ou *docking*) de substrat en son sein.

En revanche, l'étude des canaux d'accès au site actif et de l'interaction de la membrane avec le CYP2U1 ne peut se faire qu'avec des modèles plus complets (modèles 2 et 3).

II.2.2 Construction, évaluation et comparaison des différents modèles

II.2.2.1 Modeler comme outil de modélisation par homologie des P450s

Pour la construction des modèles, nous avons utilisé le programme Modeller 9v8. Comme toute construction de modèle par homologie, cette méthode nécessite l'utilisation de structure tridimensionnelles de référence, appelées *templates*, dont les séquences protéiques doivent être similaires à celle de la protéine à modéliser. Le modèle est ensuite construit en se basant sur un alignement des séquences et structures des *templates*. La méthodologie est détaillée en partie VI.1.1.1 p. 150.

Dans la pratique, plus l'homologie de séquence entre *template* et protéine cible est forte, plus le modèle sera fiable et on estime que le modèle devient robuste au-delà de 30% d'identité de séquences (Baker and Sali 2001).

❖ **Recherche et choix des structures de *template***

La séquence protéique complète du CYP2U1 est soumise à l'algorithme PSI-PLAST (*Position Specific Iterated – Protein Basic Local Alignment Search Tool*) disponible sur le site du NCBI. Ce programme compare la séquence à toutes celles dont les structures sont déposées à la PDB et en extrait les séquences les plus homologues (Altschul, Madden et al. 1997). En toute logique, les structures issues de cette recherche sont celles de P450s de la famille 2. Le pourcentage d'identité de séquence entre la séquence du CYP2U1 et celle des meilleures structures est d'environ 40%.

Il est possible de construire un modèle à partir d'un unique *template*, cependant cette option conduit à la génération de modèles très proches de leur *template*. Etant donné que plusieurs isoformes présentent des identités de séquence avec le CYP2U1, autour de 40%, il est logique d'utiliser une combinaison de *templates*. D'autant plus que le CYP2U1 est plutôt éloigné dans l'arbre phylogénétique de l'ensemble de la famille 2, il n'y a donc pas d'argument pour privilégier un seul *template* parmi eux.

D'autre part, la sous-famille 2C est surreprésentée parmi les P450s cristallisés (les P450s 2C5, 2C8 et 2C9 ont été cristallisés). Pour ne pas biaiser la construction du modèle, nous avons choisi d'intégrer une seule structure de cette sous-famille malgré de bons scores d'alignement de toutes ces protéines dans l'analyse PSI-BLAST.

Pour la construction des modèles nous avons donc sélectionné 6 structures, issues de 6 sous-familles différentes (voir Tableau II. 1), qui serviront de *templates*.

isoforme	PDB ID	Identité comparée au CYP2U1 (%)	E-values	Recouvrement de séquences primaires alignées (%)	résolution (Å)
2D6 (humain)	2 structures dont 2F9Q	43	2.E-114	79	3.0
2R1 (humain)	3 structures dont 3CZH	42	3.E-123	81	2.3
2A6 (humain)	12 structures dont 1Z10	39	5.E-100	83	1.9
2C5 (lapin)	2 structures dont 1DT6	38	7.E-99	84	3.0
2B4 (lapin)	12 structures dont 1PO5	38	9.E-103	84	1.2
2C8 (humain)	5 structures dont 1SUO	36	2.E-98	86	1.9

Tableau II. 1 : Structures utilisées pour construire les modèles de CYP2U1. Les E-values correspondent aux probabilités d'obtenir les mêmes alignements de façon aléatoire.

❖ Deux alignements de séquences

L'alignement des séquences est une donnée critique pour la construction de modèles : la plupart des erreurs dans l'alignement conduisent à une structure fautive pour le modèle. Heureusement, ces erreurs sont facilement repérées lors des étapes de validation.

Etant donné l'alignement particulier du CYP2U1 avec les autres P450s (présence d'inserts) nous avons choisi de consolider l'alignement en utilisant deux méthodes d'alignement orthogonales (l'une basée sur les structures primaires uniquement, l'autre basée sur l'alignement tridimensionnel) :

1. Un logiciel d'alignement « classique » des séquences protéiques : MUSCLE - *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (Edgar 2004) ;
2. un logiciel d'alignement des structures 3D des *templates* : MUSTANG - *Multiple Structural Alignment AlGorith* (Konagurthu, Whisstock et al. 2006).

Les deux méthodes conduisent à des alignements quasi identiques. La différence la plus notable se trouve au niveau de l'insert 2 N-terminal (voir en Figure II. 4) et ne concerne donc que le modèle 2 (protéine soluble) : selon la méthode d'alignement, deux résidus bordant l'insert sont placés soit en amont soit en aval de celui-ci (résidus encadrés en rouge). Ces résidus s'alignent mal avec la séquence du CYP2U1 et leur positionnement par rapport à l'insert est fluctuant. Il existe donc une petite incertitude sur la position dans l'alignement des 2-3 résidus bordant l'insert. Afin de s'en affranchir, les modèles du CYP2U1 subiront un recuit simulé (voir p.60 II.2.3) sur un domaine comprenant l'insert modélisé *de novo* et les 4 résidus bordant celui-ci (2 en amont + 2 en aval). Cette opération permet d'abord de faire une recherche conformationnelle sur la boucle de l'insert et les quelques résidus bordant l'insert mais aussi l'optimisation par recuit simulé peut déboucher sur une structuration éventuelle du domaine en question tout en respectant les contraintes liées à la géométrie des résidus en amont et en aval de la boucle.

L'alignement complet Modeller est présenté en annexe p 175.

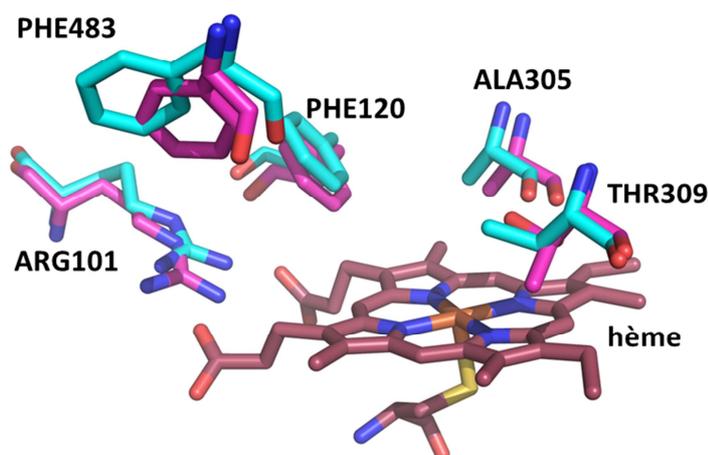


Figure II. 5 : Comparaison du positionnement de résidus du site actif du CYP2D6 dans un modèle reconstruit par Modeller et dans la structure cristallographique (PDB ID 2F9Q). La structure obtenue par RX est représentée en mauve, le modèle en cyan et l'hème en marron.

II.2.2.2 Choix et évaluation des modèles

A ce niveau de la modélisation, une pré-validation des deux modèles 1 et 2 est possible. Modeller ainsi que le serveur d'analyse structurale et de vérification du NIH (*National Institutes of Health*) fournissent un panel d'outils bioinformatiques pour l'évaluation des fichiers de structures (voir Matériels et Méthodes p150).

❖ Classement énergétique de Modeller

Modeller est capable de générer un modèle de protéine en un temps très court (quelques minutes suffisent). Ainsi pour chaque type de constructions (modèle 1 d'une protéine tronquée et modèle 2 d'une protéine soluble), 500 structures ont été produites. Toutes les structures sont d'abord évaluées par leur score énergétique DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) sous Modeller. La valeur obtenue est une énergie potentielle statistique prenant en compte les interactions possibles entre chaque atome mais aussi l'interaction avec le solvant (Eramian, Shen et al. 2006).

Il est à noter que le DOPE score n'est pas normalisé et dépend à la fois de la taille de la protéine modélisée et de ses propriétés physico-chimiques (protéine hydrophobe, hydrophile,...). Les différences entre les scores du modèle 1 et ceux du modèle 2 (qui n'ont pas la même taille) ne sont donc pas exploitables.

Toutefois, la répartition des scores pour chacun des modèles (présentée en Figure II. 6) est resserrée autour d'une valeur moyenne. Les 500 modèles générés par Modeller sont tous proches d'un

point de vue énergétique. Par la suite, les 5 meilleurs modèles sont sélectionnés (en rouge sur la Figure II. 6).

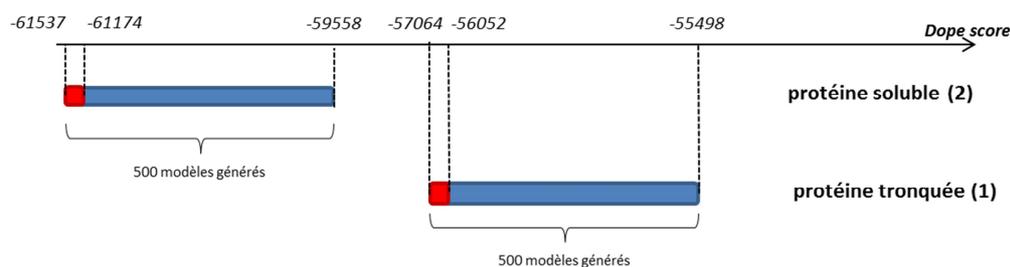


Figure II. 6 : Répartition des DOPE scores des modèles générés par Modeller. La gamme de scores des modèles sélectionnés – les 5 meilleurs – est indiquée en rouge.

❖ Evaluation des paramètres géométriques par Procheck et Verify3D

Les programmes Verify3D et Procheck sont couramment utilisés pour l'évaluation des structures tridimensionnelles (voir Matériels et méthodes, p150). Ces programmes effectuent une analyse stéréochimique de l'ensemble du modèle.

Le logiciel Verify3D analyse pour chaque résidu, la compatibilité entre son environnement (résidu appartenant à une hélice alpha, feuillet beta, boucle ; résidu polaire, apolaire,...) et sa conformation spatiale. Chaque résidu est évalué individuellement et le logiciel extrait pour chaque modèle un score global de qualité exprimé en pourcentage (le score optimal est de 100%).

Les meilleurs scores calculés pour les modèles de CYP2U1 sont de 95,12% pour le modèle 1 et de 88,48% le modèle 2. Ils sont considérés comme des modèles de bonne qualité car ayant un score élevé et supérieurs à une valeur plancher de 80%. D'autre part, ces scores se situent dans la même zone que ceux calculés par la même méthode pour les 6 *templates* issus de la PDB, sans correction ni optimisation(86 à 98%).

Le programme Procheck calcule notamment des diagrammes de Ramachadran représentés en Figure II. 7. Dans le cas des modèles de CYP2U1, 92% des résidus se trouvent dans une région favorable (ou très favorable) pour le modèle de protéine tronquée (1) et 90.5% pour le modèle de protéine soluble (2). Ce même pourcentage calculé pour les structures des templates varie de 85 à 94%.

Les modèles obtenus pour le CYP2U1 sont donc de bonne qualité, comparable aux structures cristallographiques dont ils sont issus.

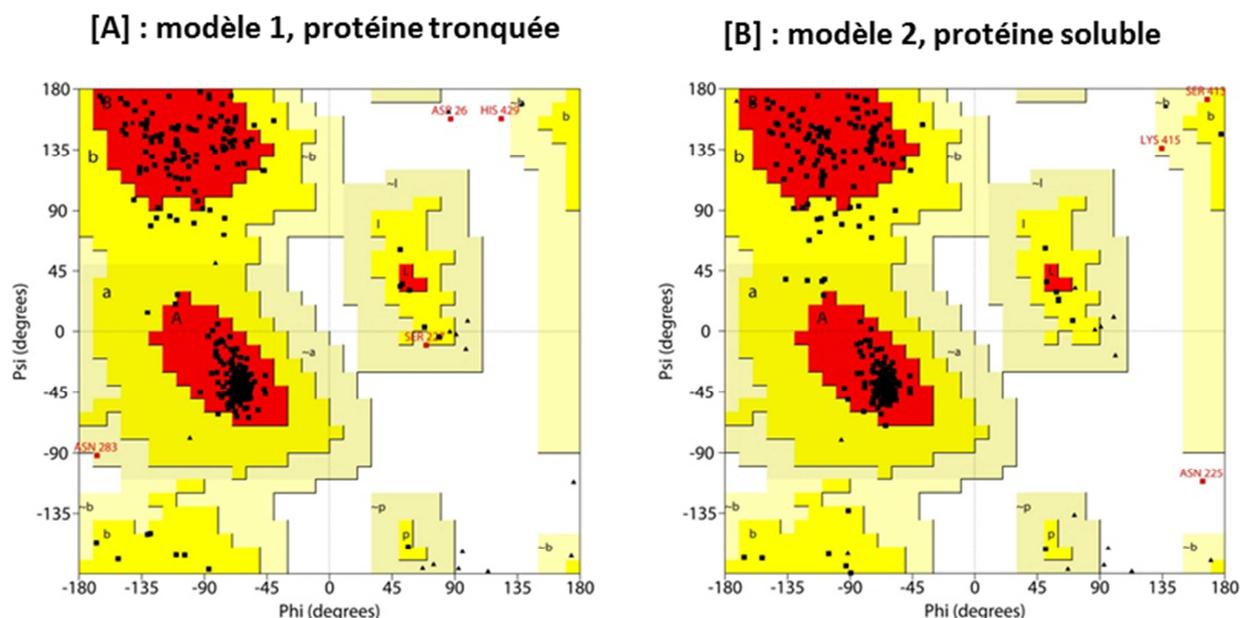


Figure II. 7 : Diagramme de Ramachandran des modèles du CYP2U1. Les triangles correspondent aux glycines et aux prolines de la protéine, les carrés aux autres résidus. Pour le modèle de protéine tronquée [A], 92% des résidus sont situés dans une zone favorable, 6.9% dans des zones défavorables, 0.1% dans des zones interdites. Pour le modèle de protéine tronquée [B], 90.5% des résidus sont situés dans une zone favorable, 9% dans des zones défavorables, 0.5% dans des zones interdites.

II.2.3 Topologie de l'insert N-terminal (modèle 2)

Le **modèle 2** possède dans son domaine N-terminal, l'insert 2, qui a été modélisé *de novo* par Modeller.

Bien que les logiciels de prédiction de structure secondaire n'attribuent pas de topologie particulière à cette partie de la protéine, nous avons cherché à confirmer ce résultat grâce aux outils de la modélisation. Pour ce faire, l'insert a subi un recuit simulé, soit directement avec Modeller, soit avec un second logiciel de modélisation, Rosetta (Mandell, Coutsias et al. 2009). Il est intéressant de comparer ces deux protocoles car Modeller utilise un algorithme de recuit simulé classique alors que le programme Rosetta possède un module spécialement conçu pour le repliement de boucles au sein de structures (méthode explicitée en partie VI.1.2 p151).

Les structures des inserts diffèrent légèrement selon le programme de reconstruction choisi. La superposition des 5 meilleurs modèles (pour le modèle 2) pour chaque méthode est présentée en Figure II. 8.

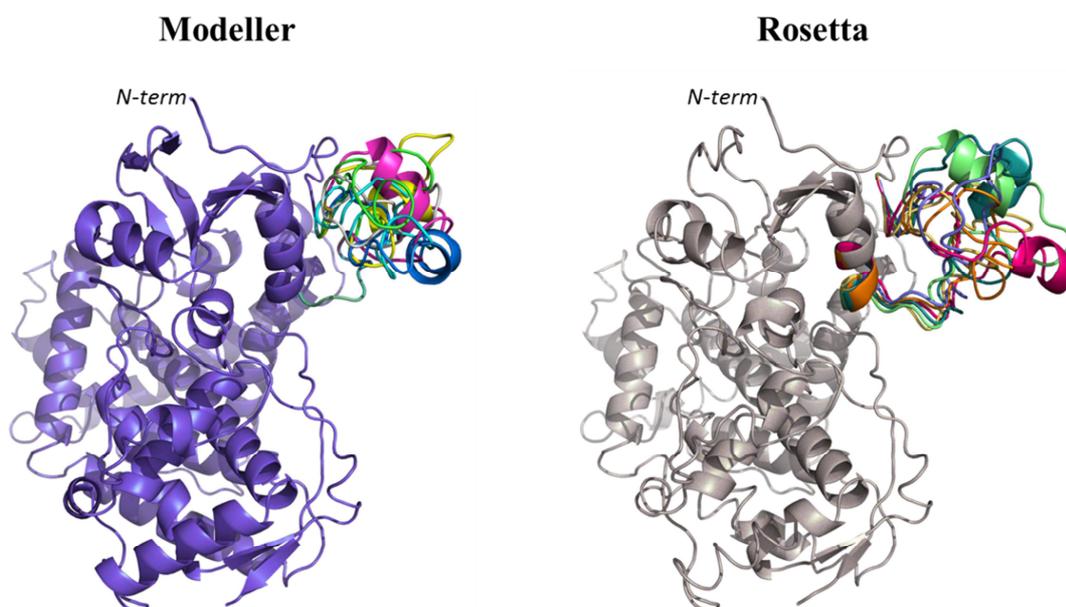


Figure II. 8 : Superposition des 5 meilleures structures du modèle 2 après recuit simulé de la boucle N-terminale sous Modeller et Rosetta. La protéine est représentée en cartoon selon la même orientation. Les structures ont été sélectionnées grâce à la fonction de score propre à chacun des deux logiciels.

On remarque que quel que soit l'algorithme utilisé, certains des modèles générés présentent un début de structuration en hélice α . Cette hélice se trouve sur la partie N-terminale de l'insert, en prolongement de l'hélice A' (qui est présente sur certains *templates* utilisés mais non conservée sur le modèle de CYP2U1). Toutefois cette hélice ne présente pas les propriétés périodiques caractéristiques d'une hélice amphiphile et le caractère hélicoïdal est perdu lors des étapes de dynamique moléculaire (*cf. infra*).

Cet insert semble donc principalement non structuré. Pour la suite des travaux de modélisation, le meilleur des modèles issus de Modeller (*DOPE score* le plus bas) a été sélectionné.

II.2.4 Optimisation des deux modèles de CYP2U1 (modèles 1 & 2)

II.2.4.1 Méthodologie

L'optimisation d'un modèle tridimensionnel peut se faire par des cycles de minimisation et de dynamique moléculaire. Ces étapes permettent au modèle de s'affranchir de gênes stériques générés par la modélisation par homologie qui n'assure pas forcément une conformation stable des résidus modélisés. Les mouvements d'atomes lors de la dynamique sont principalement ceux des chaînes

latérales qui ont la possibilité de se réarranger lors de ces étapes. Ainsi on obtient une structure affinée ayant atteint un minimum énergétique.

Ce travail est effectué sous AMBER (utilisation du champ de force et de la suite logiciel du même nom) sur des modèles préalablement solvatés. Les protocoles pour les étapes de minimisation, d'équilibration et de dynamique sont présentés en Partie VI.1.3 p.151.

II.2.4.2 Evaluation de la stabilité des modèles relaxés

Deux marqueurs traditionnels de l'évolution d'une structure au cours d'une dynamique moléculaire sont le RMSD (*Root Square Mean Deviation*) et le rayon de giration (définis en partie VI.1.5 p. 154). Leur évolution au cours des étapes d'optimisation des modèles est représentée en Figure II. 9.

Le RMSD de chaque modèle, quel que soit la méthode de calcul (calculé sur tous les atomes ou en considérant le seul squelette alpha) évolue au cours de la dynamique jusqu'à atteindre un plateau à environ de 4 ns de dynamique. A partir de ce stade, les modèles n'évoluent plus, ils ont atteint une position d'équilibre, la structure du modèle est alors proche d'une forme optimisée.

Le rayon de giration est la seconde donnée que nous utiliserons pour caractériser nos dynamiques ; c'est un indicateur de la compacité de la structure (Lobanov, Bogatyreva et al. 2008). Dans un premier temps, la protéine se dilate (0-2 ns) puis dans les 8 ns suivantes, la structure se contracte pour atteindre une valeur d'équilibre (rayon de giration à l'équilibre de 23,4 nm pour le modèle 2 et de 22.4 nm pour le modèle court 1). De plus, avec une variation d'une amplitude inférieure à 1 nm lors des phases d'optimisation on peut considérer que les modèles gardent leur structuration initiale lors de la dynamique.

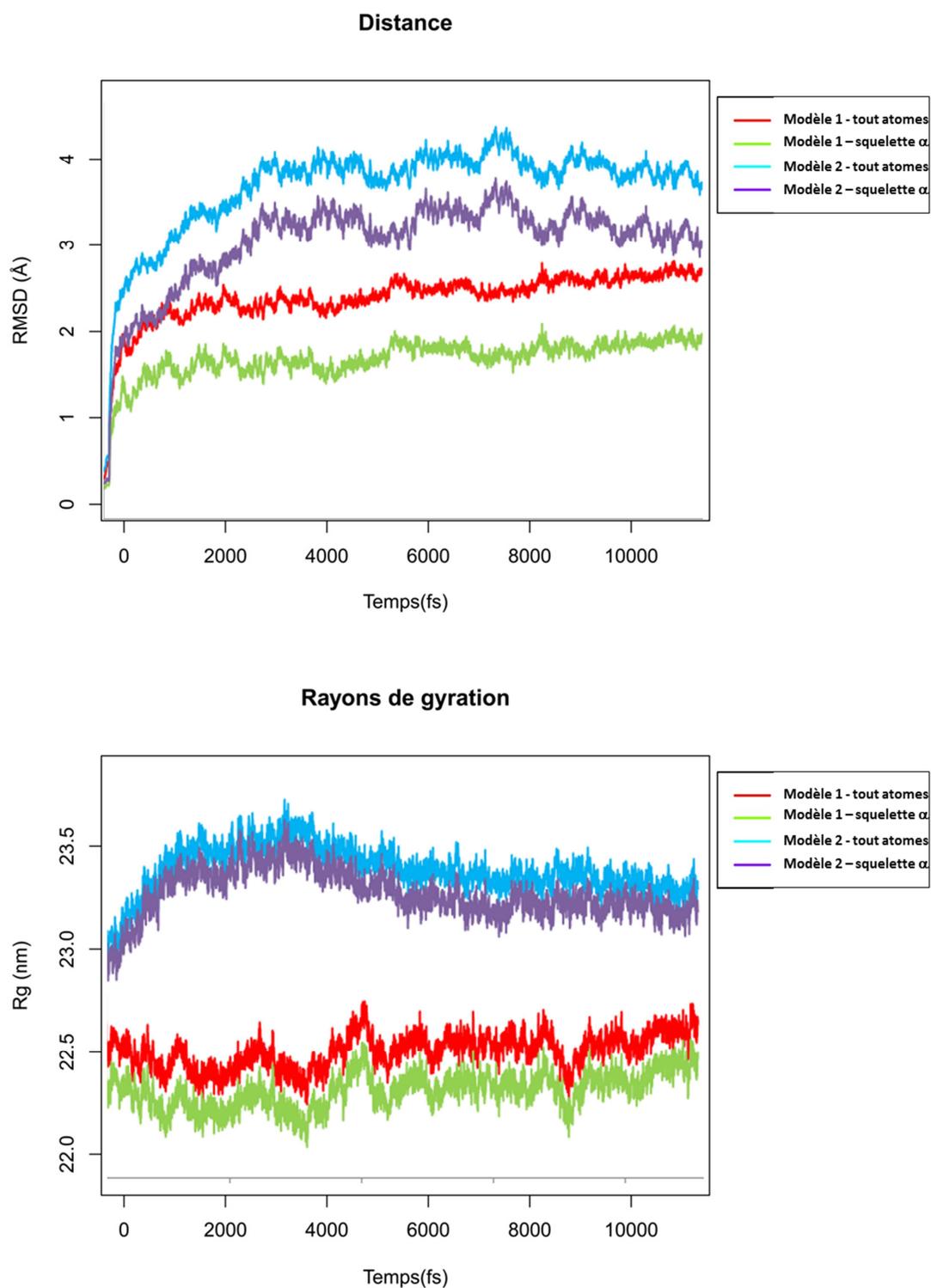


Figure II. 9 : Evolution du RMSD et du rayon de gyration lors des étapes de minimisation, d'équilibration et de dynamique pour les deux modèles de CYP2U1 (calcul Ptraj). Les paramètres sont calculés sous AMBER9.0 à 300K soit en considérant tous les atomes soit seulement les carbones α .

La variation de structure entre le modèle initial et la dernière pose de la dynamique moléculaire est mesurée par un RMSD. Les valeurs obtenues au cours de la dynamique (Figure II. 9) sont légèrement surévaluées car elles prennent en compte de la translation de la structure au cours des étapes de calcul. Une mesure sur des structures centrées dans même référentiel et superposées permet d'obtenir une valeur de RMSD entre la première et la dernière pose de la dynamique voisine de 2 \AA^3 pour les deux types de modèle (modèles 1 & 2) (Figure II. 10). Ce RMSD inférieur à la valeur limite de 5 \AA traduit une évolution optimale de la structure au cours de la dynamique : on considère généralement (Sansom and Biggin 2010) que lorsque cette valeur est inférieure à 5 \AA pour un calcul tout atome, la simulation s'est déroulée dans de bonnes conditions. Les atomes peuvent au cours de la dynamique adopter des conformations différentes que celles des modèles de départ et il n'y a pas de dénaturation de la structure de la protéine (une dénaturation de la structure serait indiquée par un $\text{RMSD} > 5 \text{ \AA}$).

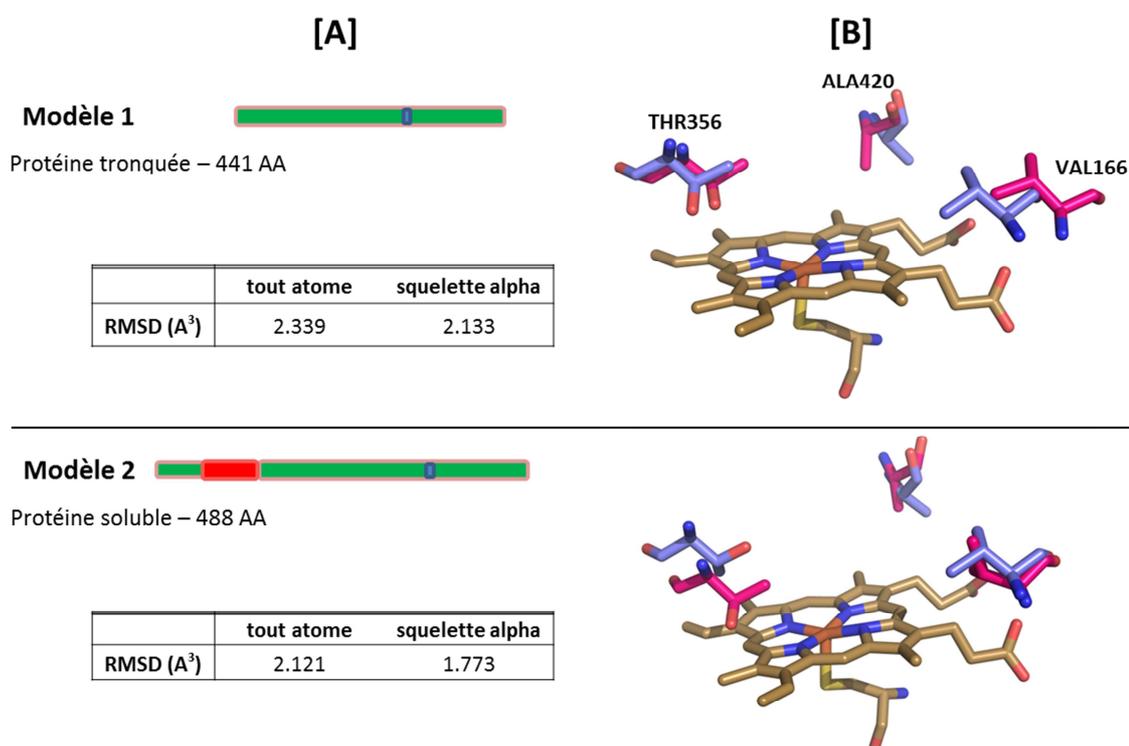


Figure II. 10 : [A] RMSD calculé entre le modèle et la dernière pose de la dynamique AMBER. [B] superposition de 3 résidus à proximité de l'hème (représenté en bâtons marron) avant dynamique (représenté en bâtons bleus) et après la dynamique (représentés en bâtons roses).

II.2.5 Description et comparaison des différents modèles

II.2.5.1 Structure générale

Les éléments de structure secondaire des deux modèles de CYP2U1 sont illustrés en Figure II. 11. Ces éléments structuraux sont identiques à ceux des autres P450s de la famille 2. Ce repliement homologue n'est pas étonnant, du fait de l'utilisation de *templates* présentant la même structure secondaire commune à tous les P450s microsomaux.

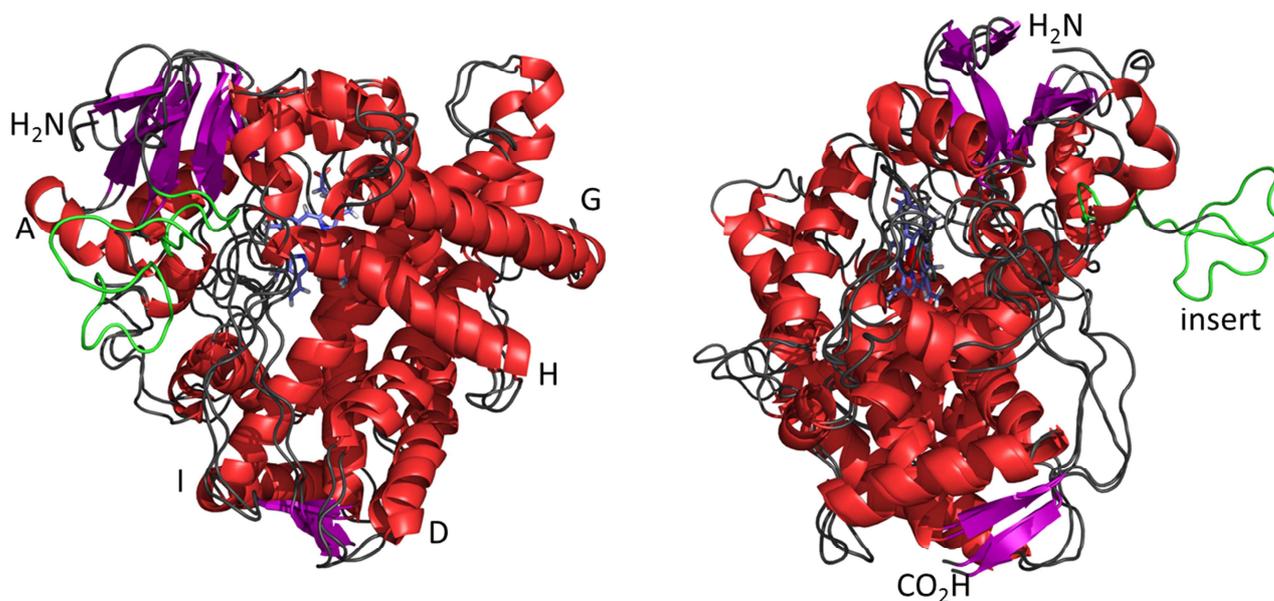


Figure II. 11 : Superposition des modèles 1 et 2 après relaxation. Les deux vues sont déduites par une rotation de 90°. Les hélices sont colorées en rouge, les feuillets β en mauve, l'insert du modèle 2 en vert et l'hème est représenté en stick. Le reste de la protéine est en gris.

Exception faite du domaine N-terminal (qui n'est pas présent pour le modèle 1), les structures des modèles 1 (protéine tronquée) et 2 (protéine soluble) sont superposables dans leur partie commune et ce, avec un RMSD de 2.2 Å entre les deux modèles. Tous les éléments de structure secondaire sont identiques dans les deux structures. De plus, on observe qu'il n'y a pas eu structuration de l'insert (en vert sur la Figure II. 11) lors de la dynamique.

II.2.5.2 Description comparée des éléments de structure secondaire du site actif

Si l'on se focalise sur le site actif des deux modèles, la similarité est encore plus importante. Les éléments structuraux constituant le site actif sont les mêmes pour les deux modèles : hélices I et F ;

boucles BC et K β 1 ; feuillet β 4. La superposition de ces éléments structuraux est illustrée par la Figure II. 12. L'arrangement spatial de la protéine dans le site actif apparaît identique dans les deux modèles. Seule la boucle BC est orientée de façon légèrement différente entre les deux modèles mais cette région de la protéine est connue pour sa forte flexibilité ce qui peut expliquer la différence entre les deux structures (Roberts, Cheesman et al. 2010). La similarité structurale des deux sites actifs est confirmée par un RMSD de seulement 1.51 Å entre tous les atomes des sites actifs des deux modèles (ont été retenus comme résidus du site actif tous les résidus dont l'un des atomes est situé à moins de 7Å de l'hème et situés en position distale).

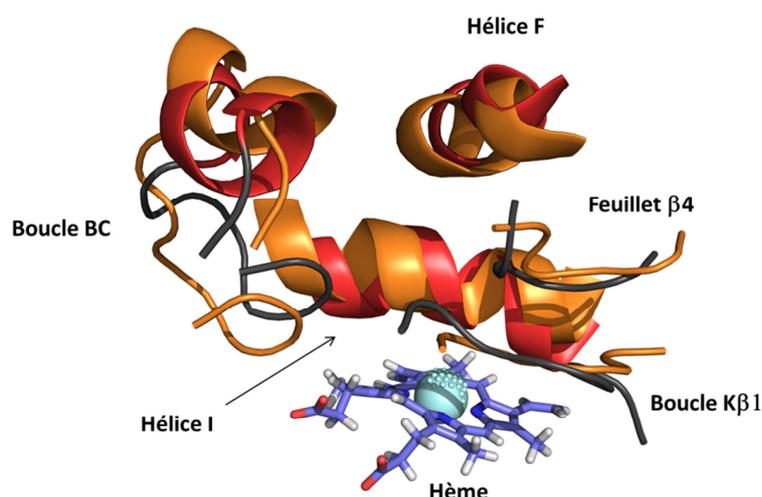


Figure II. 12 : Superposition des éléments de structure secondaire des sites actifs des modèles 1 (rouge) et 2 (orange).

II.2.5.3 Conclusion

La topologie générale du site actif ne semble pas affectée par la présence de l'insert N-terminal. Nous verrons plus tard que le volume du site actif n'est pas, non plus, impacté par la présence de cet insert (voir Partie II.4.1.2 p. 82). Ce domaine spécifique au CYP2U1 n'interviendrait donc pas directement dans la fixation du substrat au site actif. Pour cette raison, nous avons choisi de conserver le modèle le plus complet du CYP2U1, à savoir le modèle 2, pour les expériences d'arrimage moléculaire.

II.3 Interaction du CYP2U1 avec la membrane

Le rôle de l'insert N-terminal du CYP2U1 soulève un grand nombre de questions. Situé en périphérie de la structure, selon nos modèles optimisés, il n'est pas impliqué dans la liaison du substrat au site actif. De plus, l'insert se trouve à proximité immédiate d'éléments structuraux supposés enfouis dans la membrane telles que les hélices F' et G' (voir partie I.1.3.4 p.28). Il possède aussi de nombreux résidus polaires capables d'interagir avec les têtes polaires des phospholipides.

Nous avons donc cherché à prédire la position et l'orientation de la membrane sur laquelle repose le CYP2U1 et avons construit un modèle complet (P450 et membrane) afin notamment d'étudier le rôle de l'insert.

II.3.1 Prédiction de l'orientation par rapport à une membrane cellulaire

II.3.1.1 Présentation du serveur OPM

L'arrangement spatial de la membrane a été déterminé grâce au serveur OPM (*Orientations of Proteins in Membranes*) mis en ligne par l'université du Michigan (<http://opm.phar.umich.edu>). (Lomize, Pogozheva et al. 2012). Le principe de ce logiciel consiste à minimiser la fonction d'énergie de transfert ΔG en prenant comme variable l'enfouissement de la protéine (d) ainsi que son orientation (τ et ϕ) (voir Figure II. 13). L'orientation optimale est celle obtenue lorsque le minimum d'énergie est atteint. Cette méthode (et donc l'orientation des protéines par rapport à la membrane) a été validée aussi bien sur des protéines intégralement transmembranaires telles que la rhodopsine (Hubbell, Altenbach et al. 2003) que sur des protéines monotopiques telles que le Cytochrome C (Brown and Wuthrich 1977; Kostrzewa, Pali et al. 2000) et ce avec des écarts de positionnement inférieurs à 3 Å.

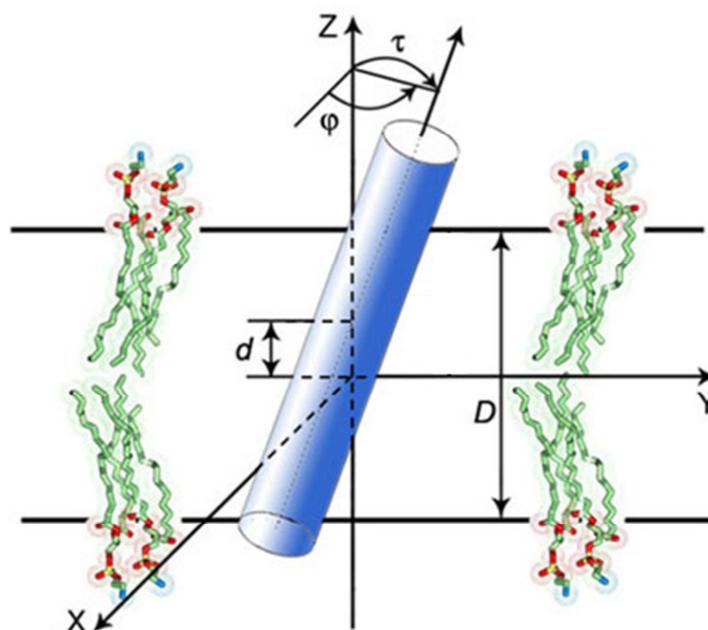


Figure II. 13 : Principe de l'orientation de la membrane par OPM

II.3.1.2 Orientation de la membrane pour les P450s de la famille 2

❖ Orientation OPM de la famille 2

L'orientation OPM de 5 isoformes superposées de la famille 2 (CYP2A6, 2C8, 2E1, 2R1 et 2U1) est présentée en Figure II. 14 [A]. Le positionnement proposé est quasi invariable : sur toutes les structures, les boucles BC et FG sont partiellement enfouies dans la membrane et l'angle formé entre deux plans membranaires de P450s est au maximum de 18° .

❖ Comparaison aux données bibliographiques.

Récemment, la position de la membrane sur une structure cristallographique de CYP2C9 a été étudiée (Berka, Hendrychova et al. 2011). La position d'équilibre de la membrane (en blanc sur la Figure II. 14 [B]) est obtenue après une dynamique moléculaire de 100 ns d'un modèle complet comprenant l'hélice transmembranaire du P450. Ce positionnement diffère peu de celui obtenu par OPM (en bleu sur le même schéma) en ce qui concerne l'enfouissement de la membrane. Par contre, l'orientation est quelque peu différente avec un angle de 24° entre la position simulée et la position OPM alors que la position simulée présente un angle entre l'hème et le plan de la membrane de 35° , ce qui est en contradiction avec les données expérimentales (Ohta, Kawato et al. 1992) (voir Partie I.1.3.4 p. 28).

❖ Cas du CYP2U1

Le CYP2U1 (représenté avec sa membrane en Figure II. 14 [C]) présente l'orientation commune aux autres isoformes de sa famille. De plus, l'angle formé entre l'hème et le plan de la membrane est de 56° , une valeur comprise entre les 38 et 78° prévus par Ohta (Ohta, Kawato et al. 1992). Enfin, on remarque que l'insert (coloré en vert) est lui aussi en interaction forte avec la membrane.

Une orientation de la membrane du réticulum est donc proposée par le logiciel OPM pour le CYP2U1. Cette position est commune à tous les P450s de la famille 2 et est en accord avec toutes les données de la littérature. Dès lors, des expériences de dynamique moléculaire en membrane peuvent être entreprises afin de répondre à deux questions : d'une part, est-ce que la position de la membrane prédite par calcul d'énergie de transfert (OPM) permet de générer un modèle complet (protéine + membrane) qui ne va pas se dénaturer lors d'une dynamique moléculaire et d'autre part, quelle est la nature de l'interaction entre l'insert du CYP2U1 et la membrane ?

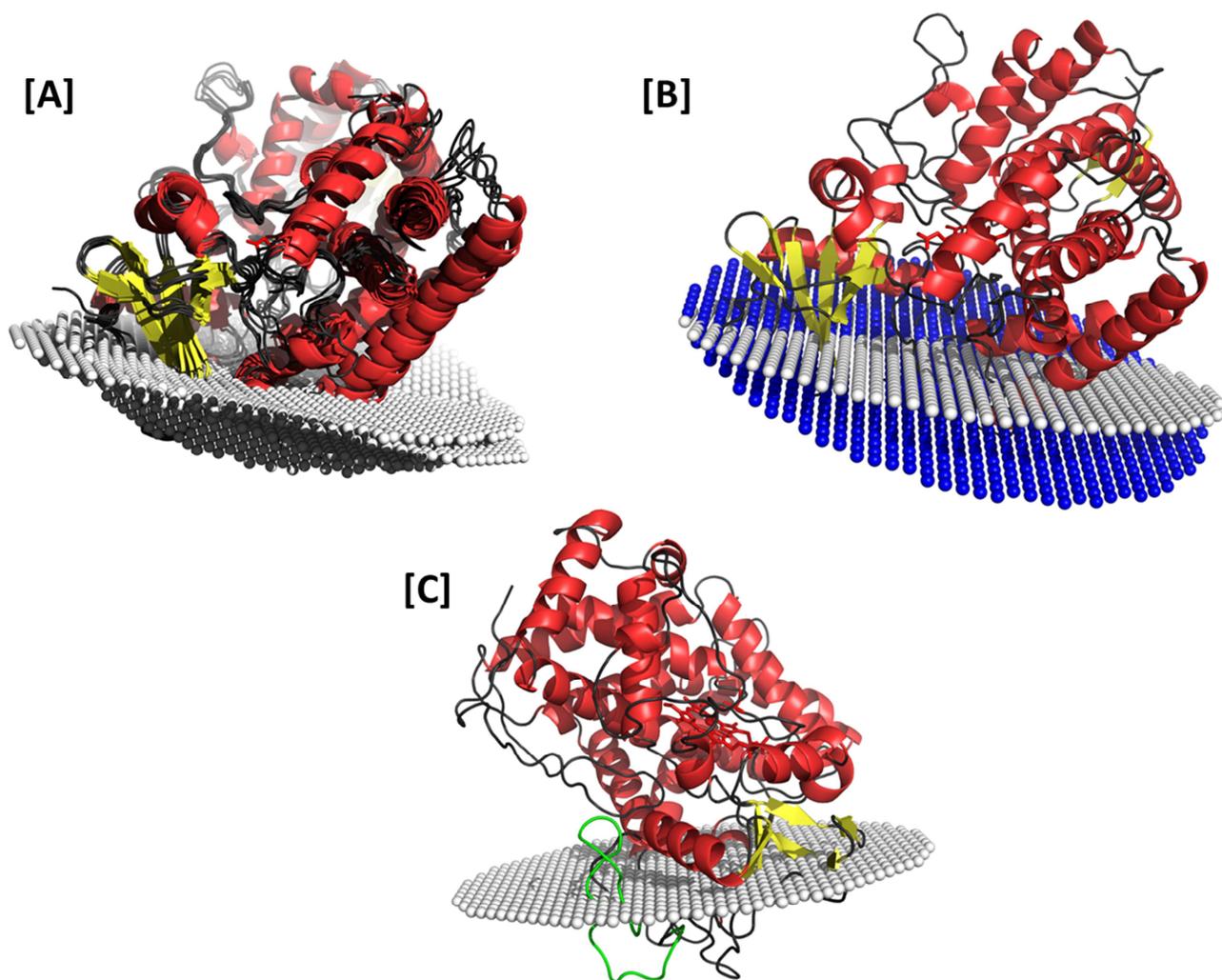


Figure II. 14 : Prédiction OPM de l'orientation de la membrane des P450s humains. [A] : superposition des structures RX des CYP2A6, 2C8, 2E1, 2R1 (codes PDB 1Z10, 1PQ2, 3E6I et 3CZH) et d'un modèle de CYP2U1 avec les positions de leurs membranes calculées par OPM. [B] : Structure du CYP2C9 (code PDB 1R9O) avec l'orientation de la membrane prévue par OPM (bleu) et celle donnée par (Berka, Hendrychova et al. 2011). [C] : positionnement de la membrane OPM sur le modèle 2 de CYP2U1. Les hélices sont colorées en rouge, les feuillets β en jaune, l'insert du modèle 2 en vert, l'hème est représenté en bâtons et le reste de la protéine est en gris. Le plan représenté pour la membrane correspond à la position des carbones C1 du glycérol de la bicouche lipidique.

II.3.2 Dynamique de 100 ns de modèles complets (CYP + membrane)

II.3.2.1 Construction d'une hélice transmembranaire

L'ajout de la membrane de phospholipides rend possible l'insertion au sein du modèle de l'hélice transmembranaire N-terminale qui sert d'ancre à la protéine dans la membrane. Cette hélice a d'abord été construite par I-Tasser¹ (Roy, Kucukural et al. 2010) puis reliée manuellement au reste de la protéine sous Pymol de telle sorte qu'elle soit orientée à la perpendiculaire de plan de la membrane. Enfin une minimisation sous contrainte a été effectuée sous Sybyl 8.0 afin d'éliminer les clashes stériques liés à la fusion des deux domaines (construction du modèle détaillée en partie VI.1.1.2 p.150).

Ce **modèle complet** du CYP2U1 est le **modèle 3**, il est comparé au modèle de protéine soluble (modèle 2) lors de deux dynamiques moléculaires lancées en parallèle.

II.3.2.2 Préparation et description des modèles

❖ Préparation des modèles

La membrane de phospholipides est ajoutée au modèle à la position prédite par OPM. Nous avons choisi une membrane composée exclusivement de POPC (1-Palmitoyl-2-Oleyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine) étant donné que les phosphatidylcholines représentent plus de 50% des composants du réticulum endoplasmique (van Meer, Voelker et al. 2008). Les protocoles de construction, de minimisation, d'équilibration des modèles sont détaillés en partie VI.1.4.1 p. 152.

❖ Description des deux modèles avant dynamique

Les deux modèles sont incorporés dans des boîtes (parallélépipèdes) d'eau et de lipides de grande taille incorporant plus de 100000 atomes (voir Figure II. 15). Afin d'éliminer les effets de bords lors des simulations, une couche externe de solvant de 10 Å est ajoutée au modèle

La présence d'une hélice transmembranaire sur le modèle 3 induit une plus grande perturbation de la bicouche de POPC. De plus celle-là se situe en périphérie de la boîte de solvatation. Pour ces deux raisons, les dimensions en X et Y du modèle 3 ont été augmentées (passant de 88 à 95 Å). Cette

¹ <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

modification entraîne l'augmentation du nombre de molécules de POPC et éloigne l'hélice du bord de la simulation.

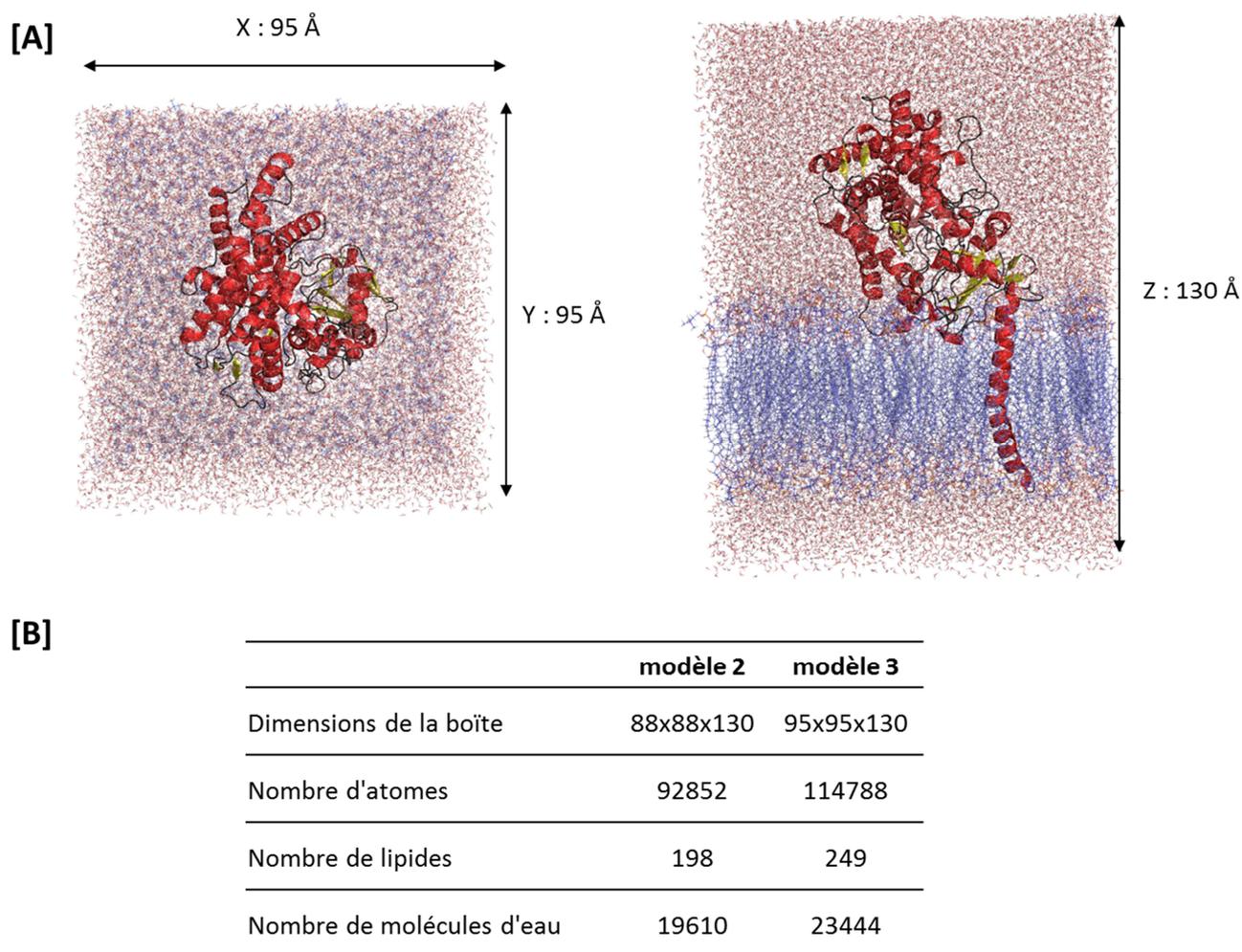


Figure II. 15 : Les modèles de CYP2U1 en membrane. [A] : représentation du modèle 3 du CYP2U1 (vue de dessus - gauche - et de côté - droite-) en interaction avec une membrane de POPC. Les hélices sont colorées en rouge, les feuillets β en jaune, les molécules de POPC en bleu, l'hème ainsi que les molécules d'eau sont représentés en bâtons. [B] : Principales caractéristiques des simulations des modèles 2 et 3.

II.3.2.3 Stabilité et validation des deux modèles en membrane

❖ Stabilité des modèles lors de la dynamique

La stabilité des deux modèles est évaluée sur une dynamique de 100 ns. Les évolutions au cours du temps du RMSD et du rayon de giration sont présentées en Figure II. 16. On constate que les valeurs de RMSD évoluent jusqu'à atteindre un plateau à partir de 30-40 ns de dynamique. Cette première phase de dynamique (de 0 à 40 ns) est donc à considérer comme une phase d'équilibration au cours de

laquelle la matrice (ions, solvant et lipides) et les modèles se réarrangent afin d'adopter une conformation optimale.

Le rayon de giration est stable à partir de quelques dizaines de ns. Pour le modèle 2 (sans hélice transmembranaire), le rayon de giration est constant tout le long de la dynamique à une valeur centrée autour de 23.6 Å si l'on considère tous les atomes. En revanche, le rayon de giration du modèle 3 diminue en début de dynamique pour atteindre un palier à 27.6 Å. Cette diminution du rayon de giration peut être attribuée à une contraction de la structure dans les premiers temps de la dynamique du fait de la pression de l'environnement membranaire.

2U1

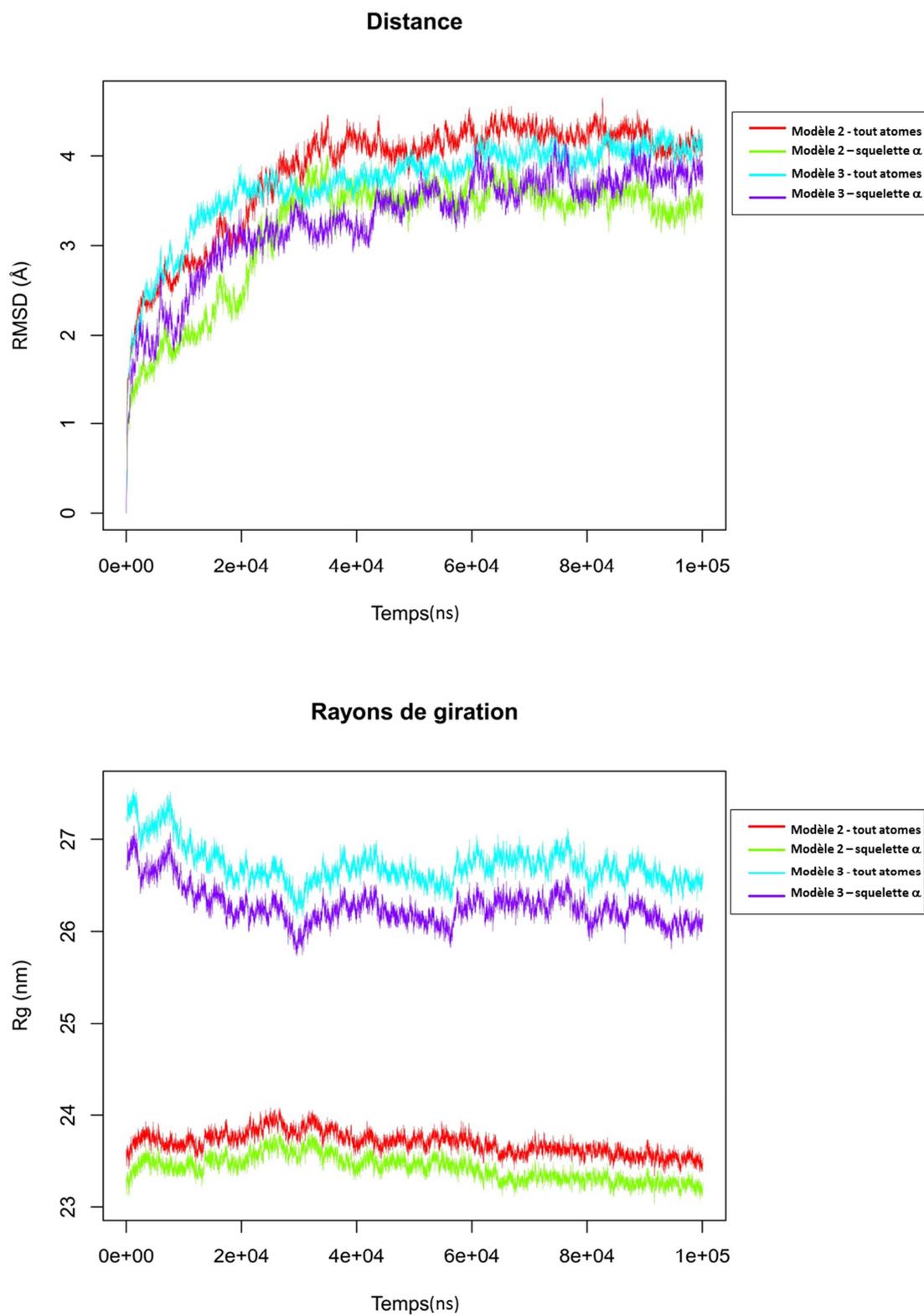


Figure II. 16 : Evolution du RMSD et du rayon de giration lors de la dynamique effectuée sous NAMD/CHARMm pour les deux modèles de CYP2U1 (modèles 2 et 3 - calcul Ptraj) à une température de 300K. Les données sont obtenues soit en considérant tous les atomes soit seulement le squelette alpha.

- ❖ Evolution de l'orientation de la protéine par rapport à la membrane au cours de la dynamique

Un suivi du positionnement de la membrane a été effectué au cours de la dynamique afin de s'assurer de la stabilité du complexe enzyme/membrane. Pour cela divers paramètres ont été calculés :

1. La profondeur d'enfouissement de la protéine dans la membrane est mesurée par la distance, notée D (voir Figure II. 17 [A]), entre le centre de masse des atomes de carbone C1 des molécules de POPC¹ (ce qui correspond à un point fixe dans la membrane) d'une part et le centre de masse des carbones α de la protéine d'autre part. Afin de pouvoir comparer les valeurs pour les deux modèles, seuls les carbones α des résidus 57 à 544 ont été sélectionnés pour le modèle 3 – ie les carbones α communs à ceux du modèle 2. Le suivi est donné en Figure II. 17 [B]. On constate que les courbes d'évolution de D en fonction du temps sont similaires pour les modèles 2 et 3. La présence de l'hélice transmembranaire n'affecte donc pas la profondeur d'enfouissement du P450 dans la membrane. Toutefois, dans les deux cas, on observe une **diminution de la distance D au cours de la dynamique**. De 43 Å initialement, cette distance se réduit pour atteindre à partir de 40 ns de dynamique une valeur d'environ 38 Å. Cela peut s'interpréter comme un mauvais placement initial de la protéine, placement qui est rapidement corrigé par la dynamique.
2. L'orientation de la protéine est mesurée par deux angles, notés α et β , (voir Figure II. 17 [A]) qui correspondent aux angles formés entre un vecteur correspondant à l'hélice I (respectivement l'hélice F) et le plan de la membrane pour α (respectivement pour β). L'évolution de ces deux angles au cours de la dynamique est représentée en Figure II. 17 [C]. Les mouvements angulaires de la protéine au cours de la dynamique sont relativement limités. L'angle entre l'hélice I et le plan de la membrane (angle α) oscille pour les deux modèles autour d'une valeur moyenne de 32° avec des variations faibles (de +/- 10°). Il en est de même pour l'angle entre l'hélice F et le plan de la membrane (angle β) dont la valeur oscille autour de 11° au cours de la dynamique.

¹ Les atomes C1 correspondent à l'un des trois atome de carbone du groupement glycérol

Ainsi, les deux modèles de CYP2U1 en interaction avec les phospholipides conservent une orientation commune par rapport à la membrane au cours de la dynamique (faible évolution des paramètres évaluant l'orientation de la membrane : distance D , angles α et β). Au cours des 40 premières nano secondes, on observe un mouvement d'enfouissement de 5 Å de la protéine dans la membrane jusqu'à atteindre une position d'équilibre. La position initiale « OPM » de la membrane est donc **optimisée** lors de cette étape de dynamique moléculaire.

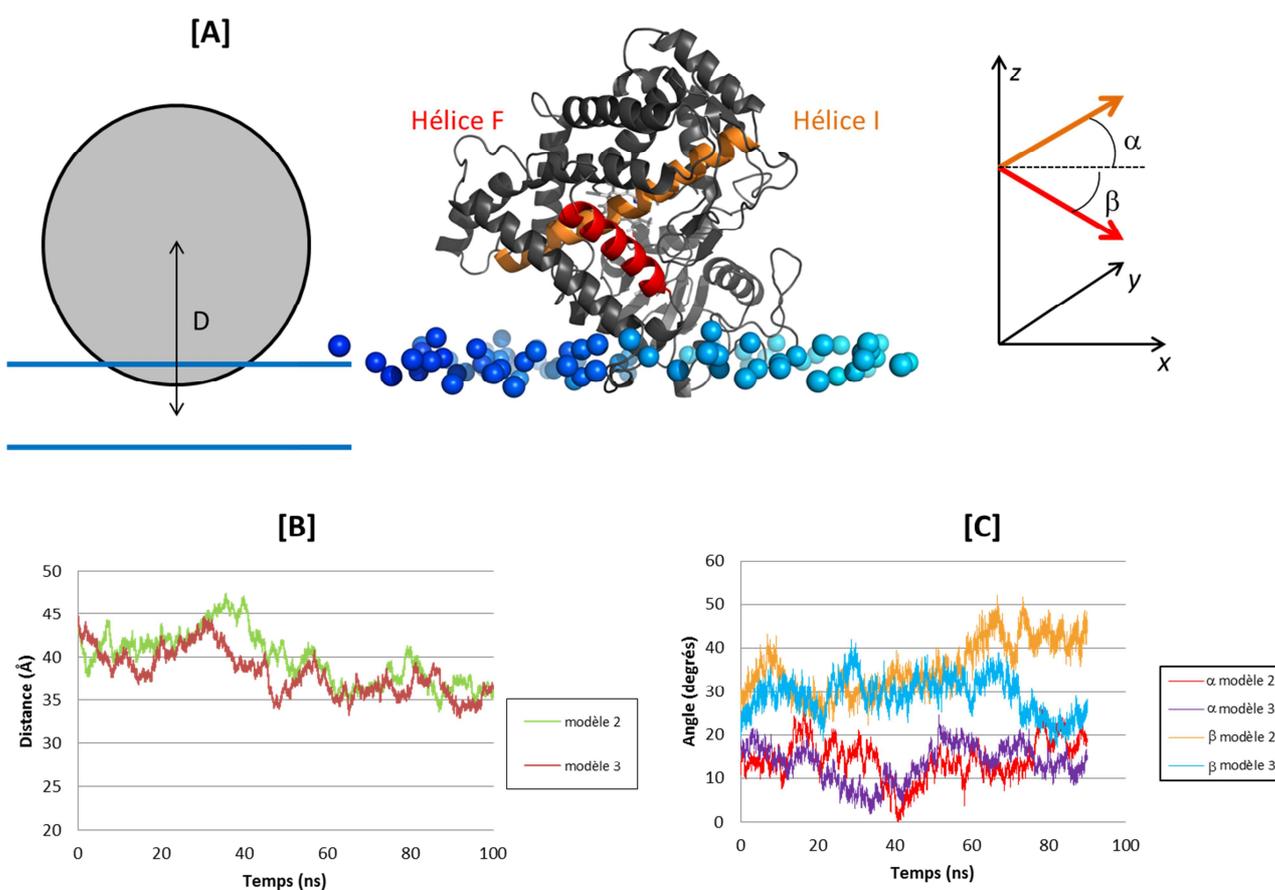


Figure II. 17 : Orientation de la membrane au cours de la dynamique. [A] gauche : Illustration de la distance D mesurée entre les centres de masses des C1 des lipides et $C\alpha$ du CYP2U1. centre et droite : Orientation des hélices I et F du CYP2U1 par rapport à la membrane (l'hélice I est en orange, l'hélice J en rouge, un plan représentant la membrane est illustré par des sphères bleues). [B] Evolution de la distance D au cours de la dynamique. [C] : Evolution des angles α et β au cours de la dynamique.

❖ Effet de l'hélice transmembranaire sur la flexibilité du modèle.

La flexibilité des structures des P450s a déjà fait l'objet de nombreuses études (Poulos 2003; Jiang and Ghosh 2012) et permet de différencier les zones structurales rigides de celles plus flexibles pouvant correspondre, par exemple, à des entrées de canaux d'accès des substrats au site actif.

Le profil des facteurs B (représenté en Figure II. 18) a été calculé pour les deux modèles au cours d'une fraction de la dynamique (entre 20 et 60 ns) pour écarter du calcul des facteurs B les phases d'équilibration de la protéine.

Ce profil fait apparaître des zones flexibles communes qui correspondent aux boucles entre les hélices et/ou feuillettes. Ces domaines de flexibilité sont communs à tous P450s d'eucaryotes et le profil de facteur B de nos simulations est similaire à ceux des structures cristallographiques (Graham and Peterson 1999; Cojocaru, Winn et al. 2007).

De plus, l'hélice transmembranaire présente une grande souplesse (cette particularité a déjà été observée avec l'étude du CYP2C9 (Berka, Hendrychova et al. 2011)) et sa présence modifie la flexibilité de certains domaines du reste de la protéine :

- Les boucles qui ne sont pas en contact avec la membrane (ex : hélice H/I) ne sont pas influencées par l'ajout de l'hélice ;
- dans les régions en contact avec la membrane, la flexibilité est diminuée dans le modèle comprenant l'hélice transmembranaire –modèle 3-(c'est le cas pour les hélices C/D et F/G).

Globalement, l'analyse des facteurs B montre qu'il y a cohérence entre les simulations des modèles 2 et 3 du point de vue de la flexibilité liée à la présence de l'hélice transmembranaire. La présence de celle-ci rigidifie le complexe membrane-enzyme (diminution drastique des facteurs B dans l'insert, les boucles BC et FG,...) et bloque la flexibilité de certaines boucles. Cela remet en question nombre d'interprétations sur la malléabilité des P450s extraites de dynamiques hors membrane (Poulos 2003).

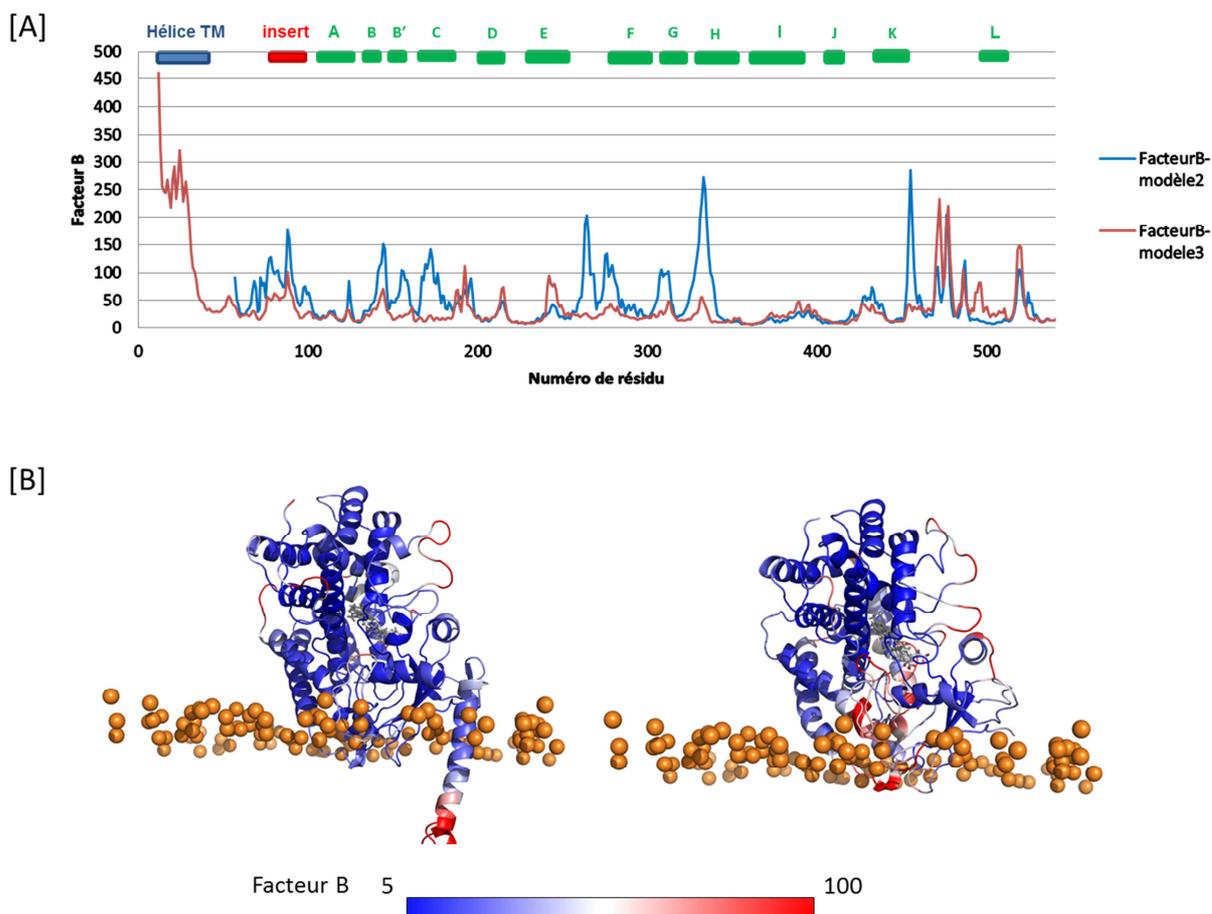


Figure II. 18 : Fluctuations structurales lors de la dynamique (fractions de dynamique entre 20 et 60 ns). [A] : Facteurs B calculés lors d'une dynamique de 100ns en membrane pour les modèles 2 et 3. [B] : représentation des facteurs B sur les structures des modèles 2 (à droite) et 3 (à gauche de la figure). Les résidus sont colorés selon leur facteur B avec un gradient allant du bleu pour les plus rigides au rouge pour les résidus les plus flexibles. Le plan de la membrane est représenté en sphères orange.

II.3.3 Interaction de l'insert avec la membrane

II.3.3.1 Repliement de l'insert dans la membrane

Initialement, l'insert N-terminal se trouve plongé dans la membrane et reste enfoui au cours de la dynamique. Nous avons voulu savoir quel peut être le repliement de cet insert au contact la membrane, la nature des interactions mises en jeu et en déduire quelques hypothèses sur le rôle de ce domaine.

❖ Evolution du RMSD de l'insert : un repliement stable

Pour cette étude, la dynamique a été prolongée jusqu'à 120 ns afin d'étudier l'ensemble des modifications

Le repliement initial adopté par l'insert 2 provient des précédentes simulations pour lesquelles la protéine était dans un environnement seulement solvaté. On peut donc s'attendre à des modifications

conformationnelles lorsque l'insert est plongé dans une membrane. Sur la Figure II. 19, en suivant l'évolution du RMSD des carbones α de l'insert 2, on peut décomposer les mouvements de l'insert en 4 phases :

- Lors d'une première phase (de 0 à 20 ns), l'insert du modèle 2 (sans hélice transmembranaire) évolue lentement pour atteindre un état stable (son RMSD n'évolue plus au-delà de 20 ns) alors que le modèle avec hélice transmembranaire évolue rapidement dans les toutes premières nanosecondes (phase d'adaptation conformationnelle) ;
- de 20 à 75 ns (Phase 2), l'insert des deux modèles n'évolue pas ;
- de 75 à 100 ns (Phase 3), l'insert du modèle 3 évolue pour atteindre un état stable ;
- à partir de 100 ns (Phase 4), plus aucune modification conformationnelle n'est observée : les deux structures de l'insert sont stables.

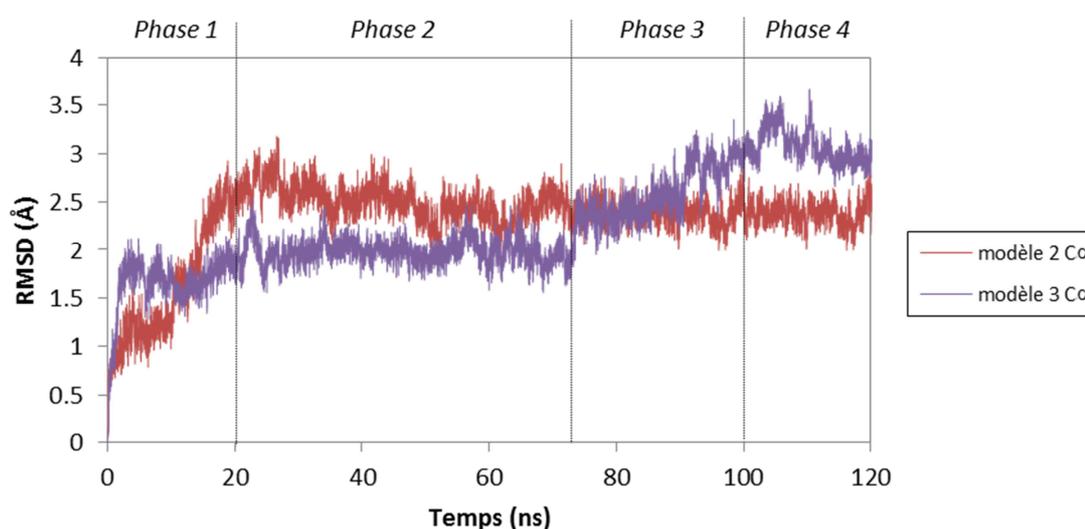


Figure II. 19 : Evolution des RMSD des carbones α de l'insert 2 du CYP2U1 lors de la dynamique

On peut donc espérer avoir atteint la conformation d'équilibre au-delà de 100 ns. Effectivement, à partir de 100 ns de dynamique, on constate que la structuration de l'insert n'évolue plus. La comparaison des deux structures finales des inserts (modèle 2 et 3) montre que celles-ci sont identiques en fin de dynamique. Ce repliement final de l'insert au sein de la bicouche est illustré en Figure II. 20. Ainsi, bien que le temps nécessaire à la structuration de l'insert diffère selon la présence ou non de l'hélice transmembranaire, un repliement commun est adopté en fin de dynamique ce qui est remarquable car les deux systèmes auraient pu évoluer vers des conformations distinctes. Ce repliement doit nécessairement correspondre à une conformation stabilisée de l'insert dans la membrane.

Le temps nécessaire pour obtenir le repliement final de l'insert est plus long pour le modèle 3 car, comme nous l'avons vu avec l'étude des facteurs B, la présence de l'hélice transmembranaire augmente la rigidité des résidus en contact avec la membrane (l'insert entre autres) et rend plus difficile et plus lent le réarrangement structural de l'insert.

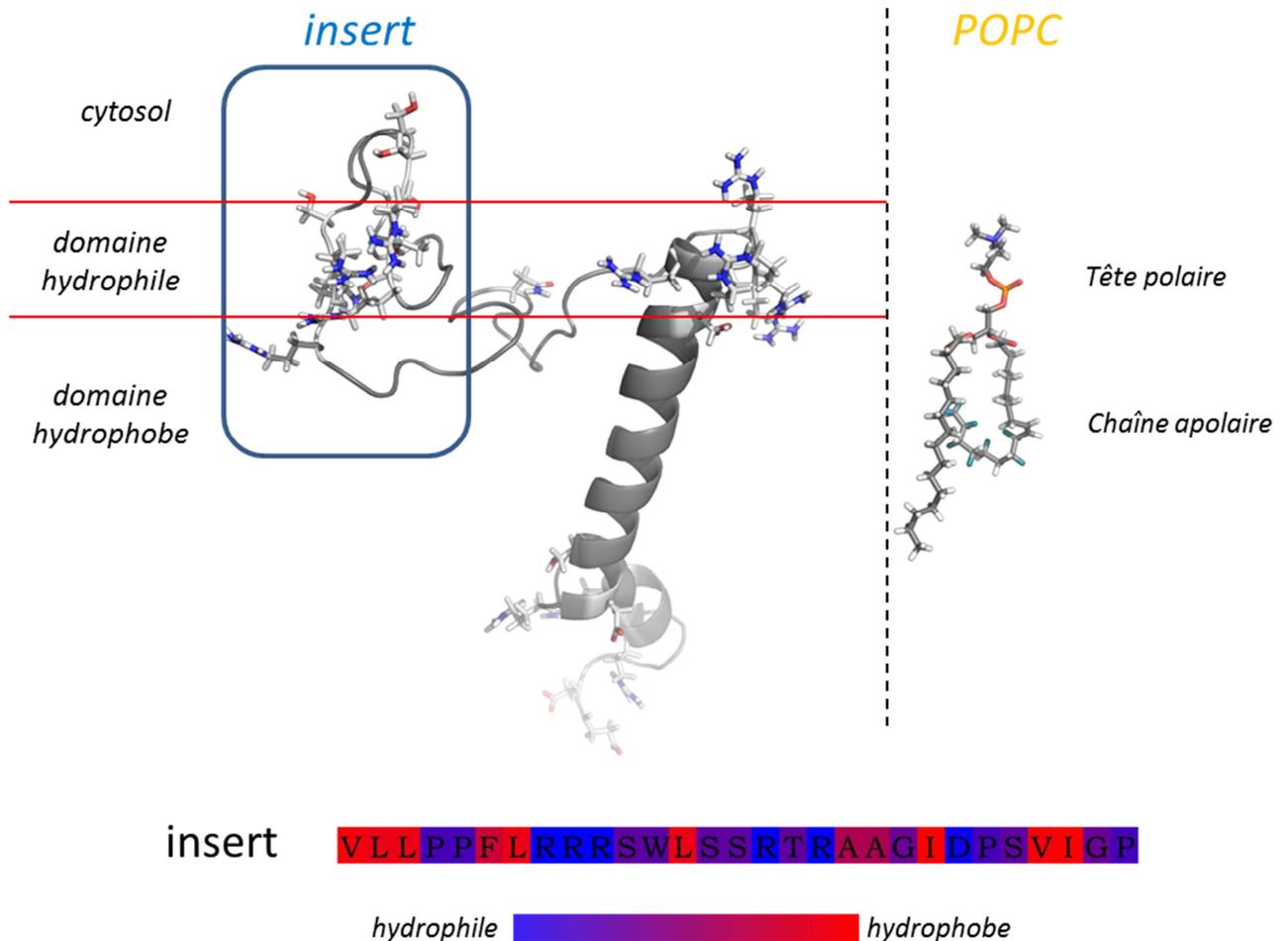


Figure II. 20 : Repliement commun aux deux modèles de l'insert 2 en fin de dynamique. Le domaine N-terminal de la protéine (modèle 3) est représenté en cartoon, les chargés hydrophobes en bâtons. La surface de la membrane est schématisée par les traits rouges (zone polaire de la bicouche)

❖ Liaisons hydrogènes avec les phospholipides

Le repliement de l'insert 2 dans la bicouche de POPC est dû aux particularités de sa séquence protéique. Les nombreux résidus polaires (avec notamment 5 arginines) vont s'associer par le biais de liaisons hydrogène et interactions électrostatiques aux têtes polaires des phospholipides. Certaines de ces arginines s'associent ainsi aux groupements phosphate des molécules de POPC. Les résidus apolaires de l'insert (valines, leucines, isoleucines) sont enfouis plus profondément dans la bicouche au contact des chaînes grasses des POPC.

❖ Un échange de phospholipides

L'interaction entre insert et phospholipides est forte grâce à un réseau dense de liaisons hydrogènes et électrostatiques entre insert et membrane mais permet tout de même l'échange de lipides. Ainsi sur les 4 molécules de POPC initialement en interaction avec les 3 arginines consécutives de l'insert (ARG82-ARG84) par le biais de liaisons hydrogènes et électrostatiques, on observe, au cours des 100 ns de dynamique, l'échange d'un POPC par un autre. Les éléments de la membrane en interaction avec l'insert s'échangent donc au cours de la dynamique.

❖ Rôle potentiel de l'insert

Il semble clair que l'insert 2 assure au CYP2U1 un ancrage supplémentaire à la membrane du réticulum endoplasmique grâce à de nombreuses interactions (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes). De même la présence de l'insert 1 qui rallonge le domaine extrinsèque cytosolique permet aussi un ancrage plus fort à la membrane. L'intérêt d'un point d'ancrage supplémentaire de la protéine à la membrane semble faible si l'on considère que tous les autres isoformes de P450s humains exercent leur activité catalytique sans le posséder.

On peut alors imaginer que l'insert du CYP2U1 soit capable de recruter sélectivement des substrats au sein de la bicouche (phospholipides, glycolipides, stérols,...) afin de permettre leur entrée au site actif. L'insert pourrait être aussi capable d'interagir avec certains lipides, voire avec une autre protéine membranaire non identifiée.

II.4 Etude de la topologie du site actif

II.4.1 Calcul Voidoo du volume de la cavité du site actif

II.4.1.1 Méthodologie

La cavité définie par les résidus du site actif a été calculée par le logiciel VOIDOO (Kleywegt and Jones 1994) couramment utilisé pour ce type de calculs sur des modèles ou des structures cristallographiques (Wang, Savas et al. 2011; Oakley, Vedula et al. 2012). Comme la plupart des programmes de calculs de cavité, VOIDOO introduit une sonde sphérique (dont le rayon est généralement celui d'une molécule d'eau) qui parcourt l'intérieur de la cavité. Deux types de volumes sont alors calculés, définis par deux surfaces fermées : la surface accessible au solvant (**SAS**), définie par la surface balayée par le centre de la sphère lors des contacts et la surface moléculaire accessible

au solvant (**SMAS**) définie par les contacts de Van der Waals entre la protéine et la sphère (voir partie VI.1.7 p. 157).

Par définition le volume défini par la surface accessible au solvant est un volume lissé, toujours inférieur à celui défini par la surface moléculaire accessible au solvant.

Il est à noter que les cavités peuvent être ouvertes sur l'extérieur par le biais de canaux d'accès. Il est alors nécessaire de combler virtuellement les canaux par des molécules d'eau ajoutées pour éviter une divergence du calcul VOIDOO. Dans ce cas, la valeur du volume obtenue présente une erreur de plus ou moins 100 Å³, liée à la définition de l'embouchure du canal (et donc à la localisation de la molécule d'eau) décidée par l'utilisateur.

II.4.1.2 Volume des sites actifs des modèles sans membranes (modèles 1 et 2)

Les volumes des sites actifs donnés par la littérature ont été calculés en utilisant l'un des deux modes de calcul de volume (SMAS ou SAS). Ces données, reportées dans le Tableau II. 2, sont donc difficilement comparables entre elles. Pour pouvoir comparer les valeurs des différents volumes de sites actifs, toutes les cavités des structures RX de mammifère ont été déterminées et les volumes de sites actifs calculés en utilisant les deux modes (travaux de E. Pihan et F. André, non publiés, CEA Saclay et thèse de P. Lafite). Ces valeurs ainsi que celles calculées pour les modèles de CYP2U1 sont regroupées dans le Tableau II. 2.

La valeur qui représente le mieux l'espace disponible au sein de la cavité correspond à la surface de Van der Waals et donc au SMAS. On peut alors distinguer les P450s selon la taille de leur site actif :

- Certains isoformes sont caractérisées par un volume de site actif faible (inférieur à 500 Å³ pour un volume SMAS). Ces P450s tels que les CYP2E1, 2A6, 2B4 sont connus pour oxyder des substrats de petites tailles (Guengerich 2005);
- D'autres P450s comme les CYP2J2 ou 2B6 présentent des volumes de sites actifs intermédiaires (compris entre 500 et 1000Å³) ;
- Enfin, les autres P450s présentent des volumes de site beaucoup plus grands allant de 1000 à plus de 2000 Å³ après déformation du site actif par le substrat. C'est le cas des CYP3A4 et 51A1. Ces isoformes prennent en charge des substrats de grande taille.

Le CYP2U1, avec des volumes SMAS de 911 et 931 Å³ pour les modèles 1 et 2 respectivement, fait donc partie des P450s ayant un volume de site actif de taille intermédiaire. De

plus, il n'y a pas de grande différence entre les volumes de sites actifs du modèle de CYP2U1 tronqué (modèle 1) et de CYP2U1 soluble (modèle 2). La présence de l'insert N-terminal ne modifie pas le volume de la cavité.

LE CYP2U1, UNE STRUCTURE SINGULIERE

P450	Identifiant	Substrat / Mutation	SMAS	SAS	SMAS moyen	SAS moyen	SMAS littérature	SAS littérature
19A1	3EQM	Androstenedione	456	105	456	105	400 ^p	-
1A2	2HI4	Alpha-naphthoflavone	526	89	526	89	375 ^c , 406 ^k	-
24A1	3K9V	CHAPS	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-	-
	3K9Y	CYMAL-5	- ^a	- ^a	-	-	-	-
2A13	2P85	Indole	347	72	347	72	304 ^{d,k}	-
2A6	1Z10	Coumarine	256	51	-	-	250 ^c	-
	1Z11	Methoxysalène	270	54	-	-	-	-
	2FDU	N,N-Dimethyl(5-(pyridin-3-yl)furan-2-yl)methanamine	297	62	-	-	-	-
	2FDV	N-Methyl(5-(pyridin-3-yl)furan-2-yl)methanamine	298	61	-	-	-	-
	2FDW	(5-(Pyridin-3-yl)furan-2-yl)methanamine	285	56	-	-	-	-
	2FDY	Adrithiol	404	83	307	63	-	-
	2PG5	- (mutation N297Q)	314	69	-	-	265 ^c	-
	2PG6	- (mutation L240C/N297Q)	298	56	-	-	245 ^c	-
	2PG7	- (mutation N297Q/I300V)	304	63	-	-	310 ^c	-
2B4	3EBS	Phénacétine	346	73	-	-	-	-
	3G93	1-biphenyl-4-methyl-1H-imidazole	- ^a	- ^a	-	-	-	-
	3G5N	1-biphenyl-4-methyl-1H-imidazole	- ^a	- ^a	-	-	-	-
	1SUO	Chlorophénylimidazole	272	37	383	66	271 ^e	-
	2BDM	Bifonazole	- ^a	- ^a	-	-	-	-
	2Q6N	1-(4-cholorophenyl)imidazole	493	94	-	-	-	-
2B6	1PO5	-	- ^a	- ^a	-	-	-	-
	3IBD	Chlorophénylimidazole	853	145	853	145	363 ^e (modèle) 636 ^e (mutant)	-
2C5	1DT6	-	939	238	-	-	-	360 ^f
	1NR6	Diclofénac	636	146	779	190	-	-
	1N6B	Diméthyle dérivé de sulfaphénazole	761	187	-	-	645 ^g	-
2C8	1PQ2	-	1749	374	-	-	-	-
	2VN0	Troglitazone	1230	324	-	-	-	-
	2NNH	Acide rétinolique	1406	426	1601	388	1438 ^{c,g}	-
	2NNI	Montelukast	1704	401	-	-	-	-
	2NNJ	Felodipine	1917	413	-	-	-	-
2C9	1OG2	-	1499	476	-	-	-	670 ^f
	1OG5	Warfarine	1577	492	1424	415	1667 ^l	470 ^h
	1R9O	Flurbiprofène	1197	277	-	-	-	-
2D6	2F9Q	-	527	79	527	79	540 ^f	-
2E1	3E4E	4-methylpyrazole	226	32	-	-	189,5 ^k	-
	3E6I	Indazole	217	34	-	-	190 ^x	-
	3GPH	10-imidazolyl-decanoic acid	512	97	392	68	440 ^p	-
	3KOH	8-imidazol-1-yloctanoic acid	515	97	-	-	420 ^p	-
	3LC4	12-imidazol-1-ylododecanoic acid	487	80	-	-	473 ^p	-
2J2		Modèle P. Lafite					981 ^q	113 ^q
2R1	3DL9	1-alpha-hydroxy-vitamin D2	1167	459	-	-	-	-
	3C6G	Vitamine D3	825	219	1012	306	979 ^l	-
	3CZH	Vitamine D2	1044	240	-	-	-	-
2U1	modèle 1 sans membrane		911	111	-	-	-	-
	modèle 2 sans membrane		931	98	-	-	-	-
3A4	1TQN	-	1324	356	-	-	1386 ^m	-
	1W0E	-	1257	385	-	-	-	-
	1W0F	Progestérone	1239	406	1596	558	-	520 ⁱ
	1W0G	Metyrapone	1332	462	-	-	-	-
	2J0D	Erythromycine	2321	972	-	-	2000 ⁿ	950 ⁿ
	2V0M	Kétoconazole	2103	769	-	-	1650 ⁿ	-
46A1	2Q9F	Cholestérol-3-sulfate	843	225	886	238	-	-
	2Q9G	-	930	251	-	-	-	-
51A1	3LD6	Kétoconazole	1615	459	1615	459	-	-
7A1	3DAX	-	664	123	664	123	-	-
8A1	2IAG	-	989	149	989	149	-	355 ^o

Tableau II. 2 : Volumes de cavités de sites actifs de P450s. a : structure trop ouverte pour détecter une cavité, b : (Ghosh, Griswold et al. 2009), c : (Sansen, Yano et al. 2007), d : (DeVore, Smith et al. 2008), e : (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008), f : (Williams, Cosme et al. 2000), g : (Schoch, Yano et al. 2004), h : (Williams, Cosme et al. 2003), i : (Williams, Cosme et al. 2004), j : (Rowland, Blaney et al. 2006), k : (Porubsky, Meneely et al. 2008), l : (Strushkevich, Usanov et al. 2008), m : (Yano, Wester et al. 2004), n : (Koch, Hoppmann et al. 2006), o : (Chiang, Yeh et al. 2006), p : (Porubsky, Battaile et al. 2010), q : (Lafite, Andre et al. 2007).

II.4.1.3 Oscillations du volume de la cavité lors des dynamiques en membrane

Dans les modèles membranaires (modèles 2 et 3), nous avons étudié l'évolution du volume du site actif au cours de la dynamique. Pour cela, une mesure de SMAS et de SAS est effectuée sur des structures prélevées toutes les nanosecondes (Figure II. 21). Les volumes de site actif sont relativement stables au cours de la dynamique. Les mesures de volume SMAS comprises entre 1000 et 1500 Å³ (avec une valeur moyenne 1368 ±1178 et 1404 ±126 Å³ pour les modèles 2 et 3 respectivement) et celles de volumes SAS comprises entre 250 et 500 Å³ (avec une valeur moyenne 351 ±112 et 413 ±66 Å³ pour les modèles 2 et 3 respectivement).

Ces volumes sont supérieurs à ceux calculés pour les modèles de CYP2U1 sans membrane. Cette différence s'explique du fait que les structures sur lesquelles sont calculés les volumes au cours de la dynamique ne sont pas minimisées. Une minimisation entraine en effet une relaxation des chaînes latérales des résidus du site actif vers son cœur, ce qui diminue le volume.

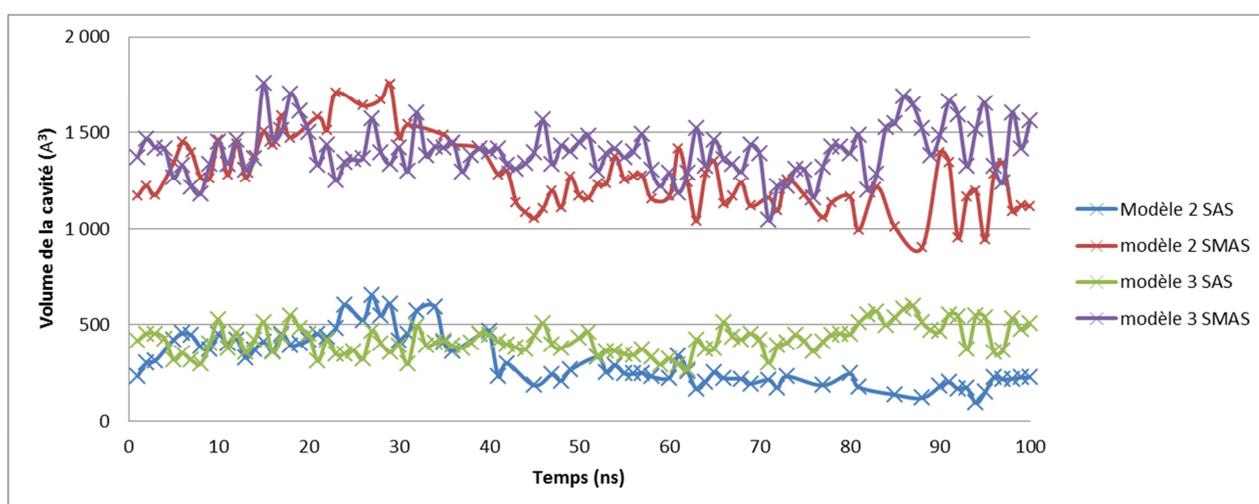


Figure II. 21 : Evolution du volume de la cavité lors de la dynamique

Il n'est donc pas pertinent de comparer les valeurs de volume obtenues au cours de ces dynamiques à celles d'autres P450s. Cependant on peut remarquer que les volumes de site oscillent de façon périodique entre un volume minima et un volume maxima au cours de la simulation. Cette oscillation est beaucoup plus visible pour les volumes de type SMAS que pour ceux de type SAS et traduit la **flexibilité du site actif**. Cette flexibilité du site actif a souvent été évoquée pour les P450s du fait de leur capacité à d'accueillir dans un même site actif un grand nombre de substrats de structures différentes. (Berka, Anzenbacherova et al. 2012).

Au niveau moléculaire, ces oscillations sont dues à des mouvements des chaînes latérales des résidus bordant le site actif, notamment la **PHE167** et la **LEU530** qui par leurs mouvements au cours de la dynamique, peuvent considérablement affecter le volume du site actif (voir Figure II. 22).

Notre simulation a permis de caractériser les fluctuations de résidus majeurs du site actif ; fluctuations qui permettent à l'enzyme de s'adapter aux substrats, le site actif ayant une plasticité liée à la mobilité de chaînes latérales, davantage qu'à la mobilité des structures secondaires qui l'entourent.

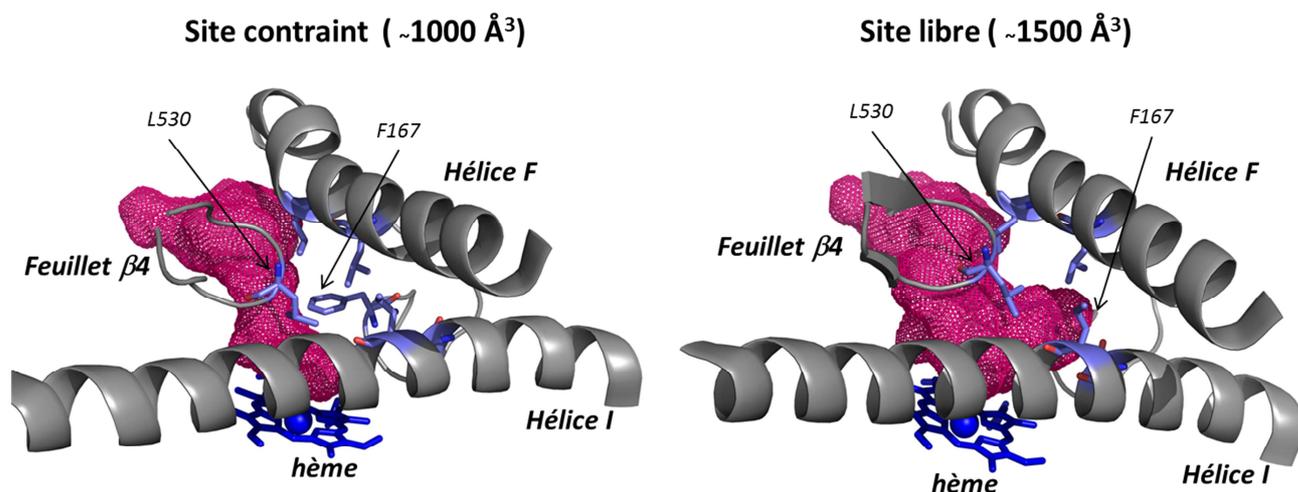


Figure II. 22 : Dilatation du site actif au cours de la dynamique. Les volumes de site SMAS calculés par VOIDOO sont représentés en grillage rose, les éléments structuraux en contact avec le site actif sont visualisés en mode cartoon gris, l'hème et les résidus influant sur le SMAS du site en bâtons bleus

II.4.2 Résidus tapissant la cavité du CYP2U1, description de la cavité

Pour poursuivre la description du site actif du CYP2U1, outre le volume de site actif, il est intéressant de donner des éléments sur sa forme et sur les résidus qui le tapissent.

La description de la topologie du site actif d'une enzyme est également un préalable avant toute expérience d'arrimage moléculaire (ou *docking*).

❖ Description de la cavité

La cavité du CYP2U1 est longée par les hélices A, F et I, par les boucles BC et K- β 1 ainsi que par le feuillet β 4 (voir Figure II. 23). Contrairement à certaines structures cristallographiques, il n'y a pas de canal visible de l'extérieur.

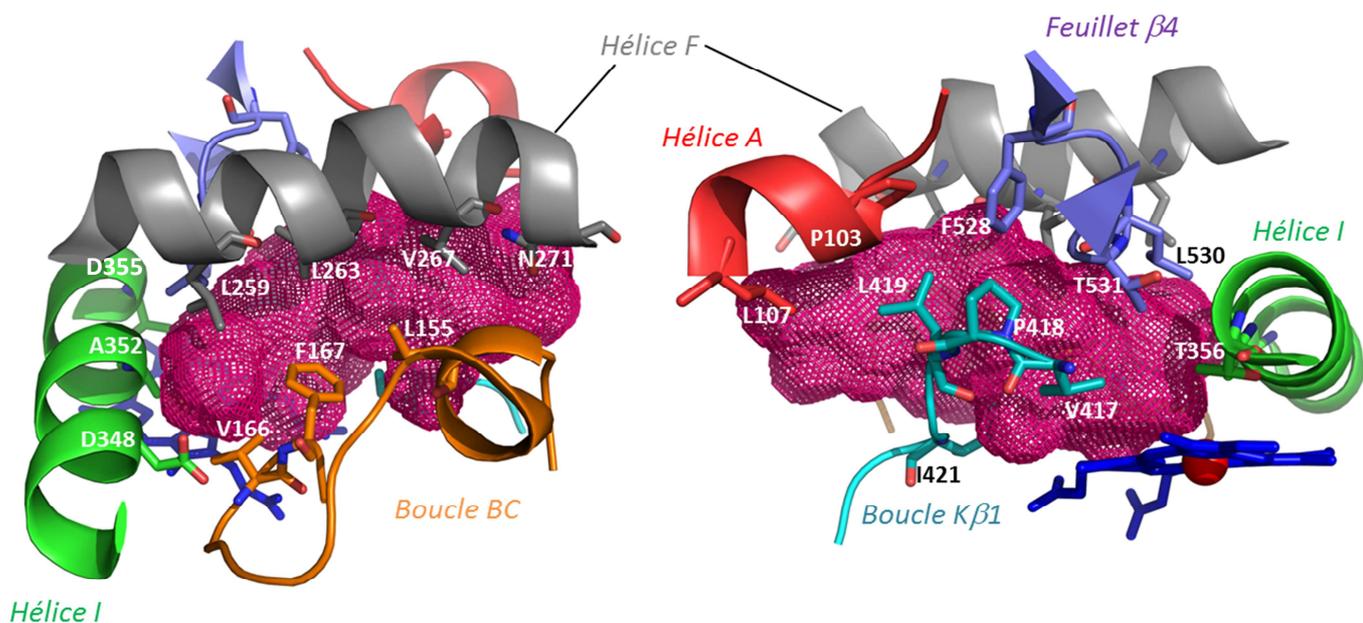


Figure II. 23 : éléments de structure et résidus tapissant le site actif du CYP2U1. La surface de la cavité calculée par VOIDOO est représentée en grillage rose, l'hème en bâton bleu, les différents résidus du site actif en bâtons colorés suivant leur élément de structure secondaire. Les deux vues correspondent à deux représentations après une rotation à 180° en gardant le plan de l'hème perpendiculaire au plan de la figure.

❖ Première couronne hydrophobe du site actif

Comparée à d'autres P450s de la famille 2 et notamment au CYP2J2 (Lafite, Andre et al. 2007), la partie de la cavité proche de l'hème n'est pas rétrécie dans le CYP2U1. Ceci est illustré par la Figure II. 24. En effet, les résidus qui bordent le site actif des P450s de la famille 2 sont relativement hydrophobes et forment une couronne qui, selon son rayon interne, restreint plus ou moins l'accès des substrats à l'hème. Contrairement au CYP2J2, il n'y a pas de gêne stérique pour le CYP2U1 qui pourra donc oxyder ses substrats sur des positions plus ou moins encombrées (ce que le site actif CYP2J2, par exemple, ne permet pas de par sa topologie).

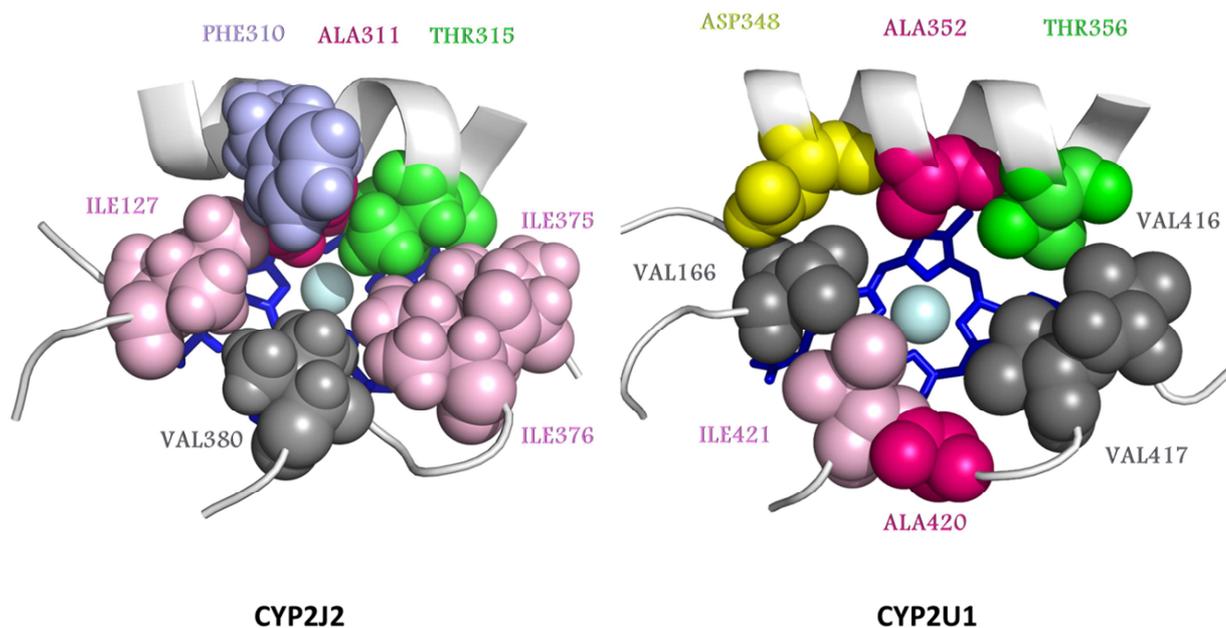


Figure II. 24 : Première couronne hydrophobe au voisinage de l'hème des modèles de CYP2U1 et 2J2. Les résidus de cette première couronne sont plus resserrés près de l'hème pour le CYP2J2 que dans le CYP2U1

II.5 Evaluation des canaux d'accès au site actif

Pour tous les P450s, le site actif est connecté à l'environnement extérieur par un jeu de canaux qui permettent le passage des substrats et produits de l'enzyme et de molécules d'eau.

L'étude de ces canaux lors d'une dynamique permet de connaître leur orientation par rapport à la membrane et dans notre cas, d'observer des ouvertures et fermetures de canaux et d'évaluer d'éventuelles interactions avec l'insert du CYP2U1.

II.5.1.1 Méthodologie

Sur le même principe que le calcul de volume de site au cours de la dynamique, une recherche des canaux d'accès au site actif a été effectuée à intervalles réguliers (toute les nano secondes) pour les deux simulations en membrane (modèle 2 soluble et modèle 3 intégrant l'hélice transmembranaire). Ces calculs sont effectués grâce au logiciel MOLE 1.2 dont le fonctionnement est détaillé en partie VI.1.6 p.155.

II.5.1.2 Canaux d'accès au site actif du CYP2U1

❖ Vue d'ensemble

Au total, 8 différents canaux ont été observés au moins une fois au cours de la simulation. Nous utiliserons la nomenclature de Rebecca Wade (Cojocar, Winn et al. 2007). Les canaux sont référencés dans le Tableau II. 3. Les résidus bordant l'entrée du canal ainsi que les éléments de structure secondaire qui définissent cette entrée sont aussi reportés dans le tableau. Ces huit canaux sont ceux identifiés « classiquement » dans les structures de P450 d'eucaryotes (Berka, Hendrychova et al. 2011) avec six canaux de la famille 2 (2a, 2ac, 2b, 2c, 2e et 2f) identifiés comme les canaux d'entrée/sortie du substrat et/ou métabolites, le canal w comme un canal dédié à la circulation de molécules d'eau et le canal S (*solvent*) pouvant transporter des molécules d'eau voire des substrats dans certains cas.

Canal	résidus encadrant l'entrée du canal	Éléments de structure secondaire bordant l'entrée du canal
2a	PHE72, ASN264, LEU 268	boucles FG et BC, feuillet $\beta 1$, insert 2
2ac	VAL159, ARG288, GLU291	boucle BC, hélice G
2c	LYS161, THR295, TYR344	boucle BC, hélices G et I
2b	VAL153, TYR125, ASN271	boucle BC, feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$
2e	ARG152, GLU162, PHE167	boucle BC
2f	ASP97, LYS163, LEU263	boucle BC, insert 2
W	GLU145, ASP149, LYS163	boucle BC, linker N-terminal
S	GLU260, ASP355, LEU532	hélices F et E, feuillet $\beta 4$

Tableau II. 3 : éléments de structure et résidus bordant l'entrée de chaque canal identifiés sur le CYP2U1

❖ Interaction des canaux avec la membrane et l'insert du CYP2U1

La position relative des canaux par rapport à la membrane peut être décrite comme suit dans le modèle 3 (voir Figure II. 25 et Figure II. 26).

- Deux canaux (S et w) débouchent dans cytosol ;
- deux autres canaux (2c et 2ac) débouchent à l'interface entre la membrane et le cytosol ;
- les autres canaux débouchent directement au niveau de la bicouche lipidique.

Le canal w débouche logiquement au niveau du cytosol car ce canal est connu pour transporter l'eau au site actif. Les canaux 2ac et S ont été proposés comme canaux de sortie des produits de réaction (Fishelovitch, Shaik et al. 2009; Sobierajski, Bruijn et al. 2011). Leurs orientations (du côté du cytosol ou à l'interface membrane/cytosol) est compatible avec ce rôle, les produits d'oxydation

étant toujours plus solubles que les substrats. Le canal S a aussi été proposé comme canal d'entrée d'eau (d'où son nom : *solvent*)

En ce qui concerne l'entrée de substrats au site actif, le CYP2U1 serait capable de prendre en charge des substrats apolaires (tels que des acides gras). Dans cette optique, ceux-ci passeraient par les tunnels en provenance de la membrane. Mais il pourrait aussi bien avoir pour substrat des molécules plus polaires, solubles dans le cytosol, qui transiteraient alors par les canaux 2c ou 2ac.

D'autre part, l'insert 2 du CYP2U1 présente la particularité d'être en interaction avec deux canaux d'accès (les canaux 2f et 2a – voir Figure II. 25). Les mouvements de l'insert lors de la dynamique pourraient donc perturber l'ouverture et la fermeture de ces deux canaux, d'où la nécessité d'effectuer une étude de l'état d'ouverture de chaque canal au cours de la dynamique.

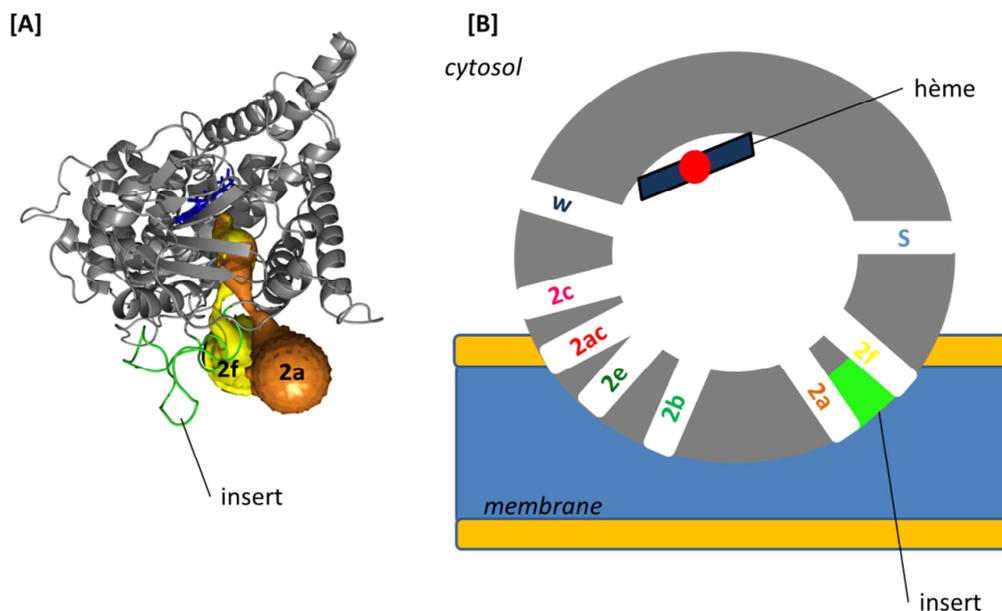


Figure II. 25 :[A] :Interaction des canaux 2a et 2f avec l'insert 2 du CYP2U1 (modèle 2 représenté), la protéine est représentée en cartoon gris hormis l'insert (vert), l'hème est en bleu, les canaux en jaune et orange. [B] : **Représentation schématique des débouchés des différents canaux du CYP2U1 associé à la membrane.**

❖ Ouverture et fermeture de canaux lors de la dynamique.

Il est à noter que des mouvements structuraux importants ont été reportés sur un autre P450 lors de l'interaction avec des substrats de grande taille (CYP3A4 et kétoconazole) (Ekroos and Sjogren 2006). Une des premières questions est de savoir s'il se produit des changements structurels importants, notamment lors de la liaison d'un substrat au site actif capables, par exemple, d'ouvrir un canal de sortie du site actif. Une des limitations des simulations en membrane est donc l'absence de substrat qui pourrait entraîner des mouvements structuraux importants.

En effet, au cours de ces deux dynamiques, il n'a pas été observé de grands changements conformationnels dans la structure du CYP2U1 qui pourraient entraîner l'ouverture et la fermeture de canaux. Il existe tout de même une dynamique d'ouverture et de fermeture des canaux d'accès due à des mouvements de faible ampleur de la structure de la protéine.

L'ouverture de chaque canal a alors été caractérisée au cours de la dynamique par deux paramètres : d'une part le taux d'ouverture global de chaque canal (présenté en Figure II. 26), d'autre part l'évolution du rayon de chaque canal d'autre part (présenté en Figure II. 27).

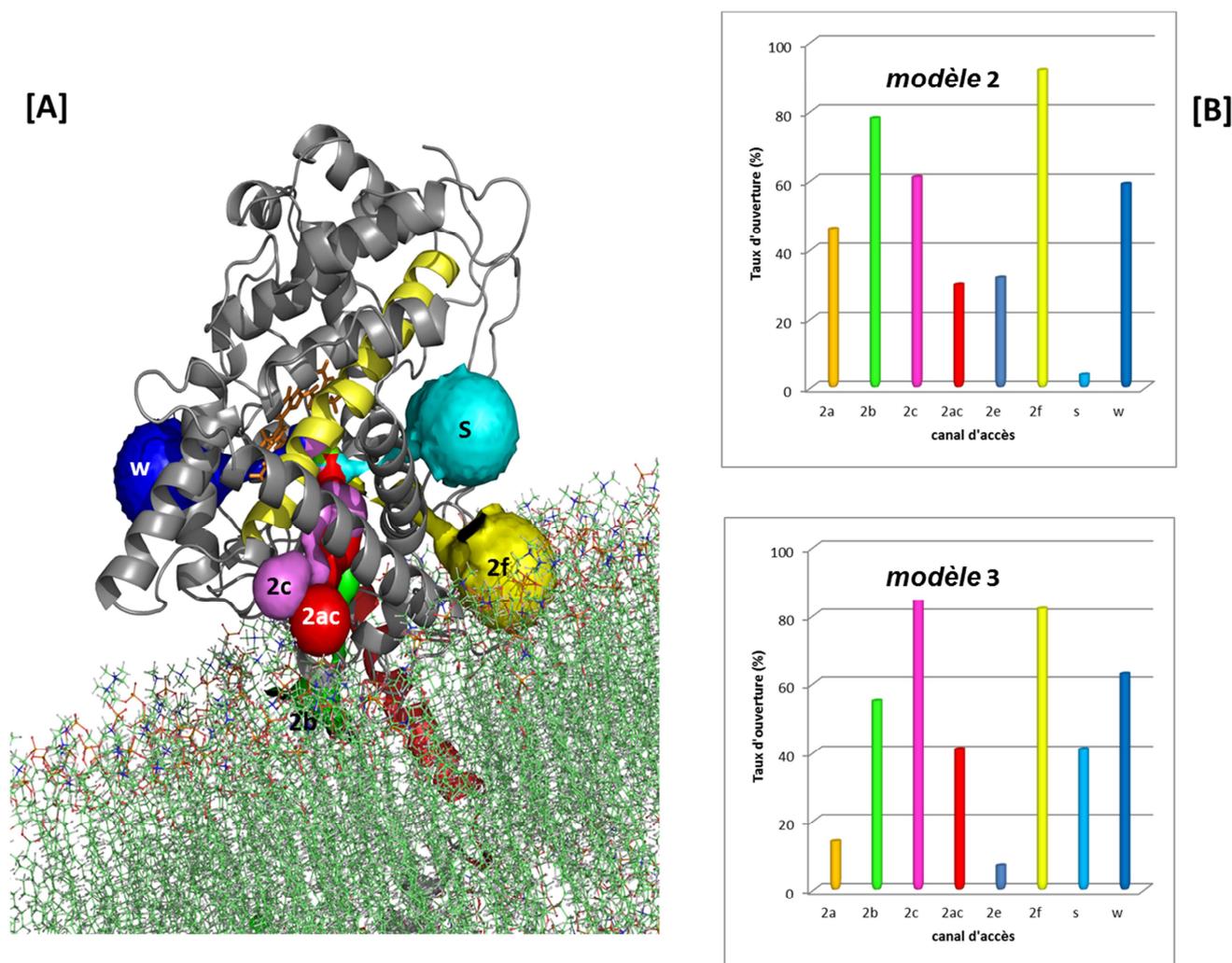


Figure II. 26 : Les canaux d'accès au site actif du CYP2U1. [A] : représentation des principaux canaux d'accès ouverts lors de la dynamique en membrane. La protéine est représentée en gris excepté l'hélice I (jaune), l'hélice transmembranaire (rouge) et l'hème (orange). L'attribution du nom de chaque canal est conforme à la nomenclature de V. Cojocar (Cojocar, Winn et al. 2007) [B] : Pourcentage des poses de la dynamique pour lequel chaque canal est ouvert (rayon minimal supérieur à 1.2 Å).

Le **canal w** d'entrée de l'eau présente un taux d'ouverture invariant quel que soit le modèle, autour de 60% dans les deux modèles. Aucune modification conformationnelle spécifique pouvant conduire à l'ouverture ou la fermeture de ce canal n'a été observée pendant 120 ns.

Le **canal 2f**, qui est en interaction à son extrémité avec l'insert, est le canal qui est le plus souvent ouvert. Il est observé dans plus de 80% des poses pour les deux modèles et ce, avec des rayons supérieurs à 2Å. Ce canal est donc l'un des principaux (sinon le principal) canal d'accès au site actif et son ouverture n'est pas perturbée par la présence de l'insert du CYP2U1.

Pour le reste des canaux de la famille 2, trois facteurs influencent l'ouverture ou la fermeture des canaux :

1. La conformation de la boucle FG : les hélices F' et G' obstruent l'embouchure du canal 2a et laissent ouvert le canal 2b. Un changement conformationnel de ces hélices a été observé conduisant à la fermeture de canal 2b et à l'ouverture du canal 2a.
2. La conformation de la boucle BC : Un mouvement du même type que celui de la boucle FG est observé ; la boucle BC oscille entre deux positions, l'une permet l'ouverture du canal 2e et laisse le canal 2ac fermé, l'autre position provoque l'inverse.
3. La conformation de l'insert 2 : des chaînes latérales de résidus situés sur l'insert peuvent obstruer le canal 2a. Cette voie d'accès au site actif peut alors rester fermée lors de longs intervalles de temps (voir Figure II. 27) mais on observe aussi lors de la dynamique du modèle sans hélice transmembranaire, de longues phases d'ouvertures de ce canal (après 50 ns). Ce canal est donc sous l'influence d'une gêne stérique par l'insert 2, mais reste un possible canal d'accès au site actif.

Le **canal S** présente un taux d'ouverture qui diffère selon le modèle étudié. En effet, ce canal est ouvert dans 40% des poses pour le modèle 3 possédant l'hélice transmembranaire alors que son taux d'ouverture est inférieur à 10% pour le modèle 2. Cette différence s'explique par un léger déplacement du feuillet $\beta 4$ lorsque l'hélice transmembranaire est présente qui empêche l'ouverture du canal. D'autre part, même si le canal S est plus souvent ouvert dans le modèle 3 que dans le modèle 2, le rayon d'ouverture de ce canal reste toujours faible (inférieur à 2\AA – voir Figure II. 27). Ce rayon maximal est peu compatible avec le passage de molécules autres que l'eau. Il est donc plus probable qu'il soit dédié au transport de molécules d'eau au site actif ou qu'il ne soit pas actif.

En conclusion, quels sont les canaux les plus favorables en termes de rayon ? (interprétation synthétique de la Figure II. 27) Dans le modèle 3, a priori le plus pertinent, les canaux 2c et 2f semblent les plus importants pour l'admission de substrats. Seul le canal 2f est sous l'influence de l'insert. Le canal w est homogène mais étroit, le canal S plutôt fermé. Le canal 2f est apte à la capture de substrats directement dans la membrane alors que le 2c peut admettre des substrats plus polaires à l'interface membrane/cytosol, voire servir de canal de sortie des métabolites.

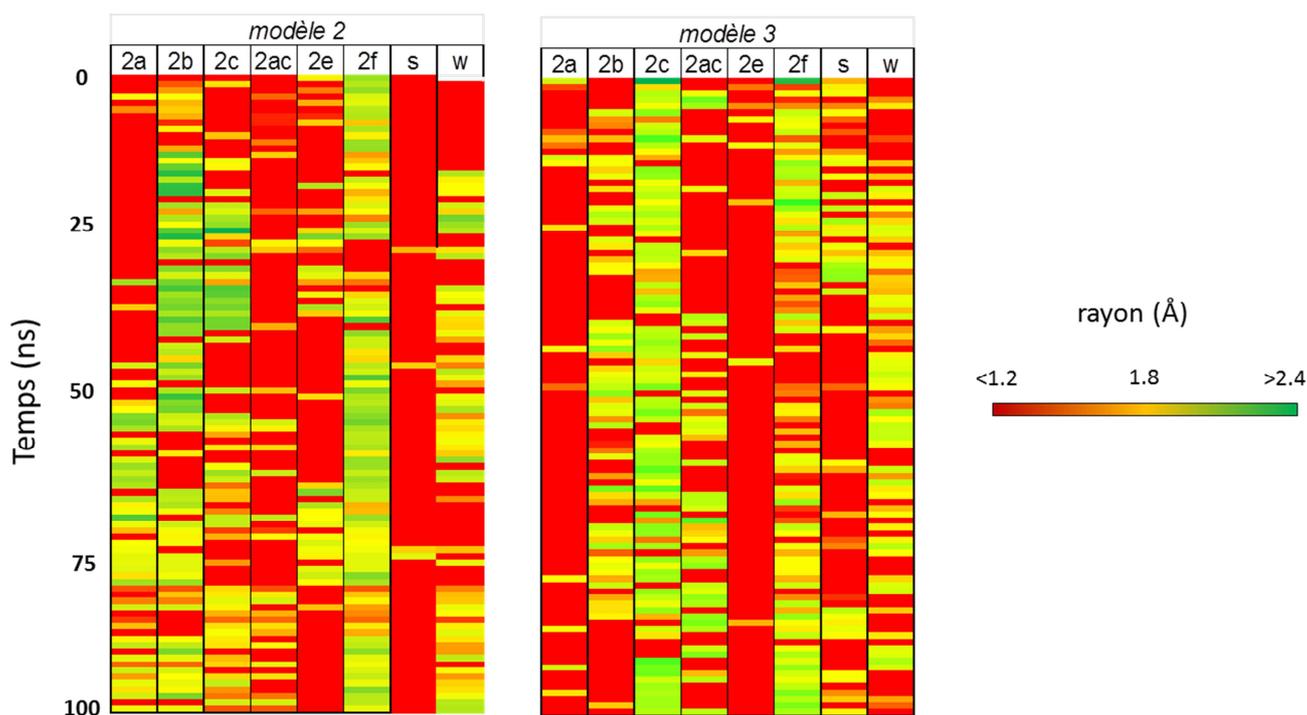


Figure II. 27 : Cinétique d'ouverture et de fermeture des canaux lors de la dynamique en membrane. Pour chaque canal, l'état d'ouverture est caractérisé au cours de la dynamique par une couleur allant du rouge (canal fermé) au vert (canal grand ouvert).

II.6 Conclusion

Le CYP2U1 offre une singularité structurale du fait de la présence de **deux inserts N-terminaux** dont l'un (l'insert 2) particulièrement inédit est riche en résidus chargés et protiques (arginines). Ces deux inserts se sont révélés inédits parce qu'ils ont des séquences totalement uniques (aucune homologie de séquence avec les autres protéines des bases de données) ce qui rend leur modélisation par homologie inaccessible. De plus la prédiction d'une structure secondaire pour ces domaines s'est révélée infructueuse ce qui indiquerait l'absence de structuration en hélice ou en brin dans cette région. Trois modèles du CYP2U1 dont le domaine N-terminal est plus ou moins tronqué ($\Delta 56$, $\Delta 104$ et protéine totale) et pour lesquels les inserts ont été reconstruits *de novo* ont donc été modélisés au cours de ce travail de thèse.

Une comparaison des sites actifs des différents modèles a montré que la présence des inserts ne modifie pas la topologie du site. Le rôle de ces inserts est donc ailleurs, peut-être dans la sélectivité de capture des substrats ou dans l'interaction de la protéine à la membrane ou à un autre partenaire.

L'intégration des modèles de CYP2U1 dans une membrane de phospholipides a mis en évidence l'interaction des résidus polaires et chargés (notamment des arginines) de l'insert 2 avec les groupes phosphates de la membrane. Cet insert pourrait offrir donc un ancrage supplémentaire du CYP2U1 à la membrane.

La topologie du site actif a été étudiée en détail sous deux aspects au cours de la dynamique:

1. Le volume du site actif a été déterminé. Il se situe dans la moyenne des volumes de sites calculés pour les autres P450s de mammifères (le SMAS calculé pour les modèles 1 et 2 sont voisins de 920 \AA^3). Lors de la dynamique, la flexibilité du site actif a été caractérisée par des fluctuations périodiques du volume de site.
2. L'étude des canaux d'accès et de leur dynamique d'ouverture montre que les canaux d'accès au substrat sont principalement dirigés vers la membrane ou à son interface. Le canal 2f se trouve en interaction avec l'insert 2 et est celui qui présente le taux d'ouverture le plus important. C'est donc, pour nous, le canal privilégié pour l'entrée des substrats.

Du fait de son interaction avec la membrane et sa proximité immédiate avec l'entrée du principal canal d'accès des substrats au site actif, il est donc possible que l'insert 2 joue un rôle dans le recrutement de substrats (lipides, phospholipides, ...) au sein de la membrane.

Enfin, maintenant que la topologie du site actif du CYP2U1 a été caractérisée (l'ensemble des résidus qui tapissent ce site actif a été référencé lors de notre étude structurale), il sera possible de confirmer les premières activités enzymatiques décelées *in vitro* par des expériences d'arrimage moléculaire (*docking*).

CHAPITRE III.

PRODUCTION DU CYP2U1 DANS UN SYSTEME HETEROLOGUE

III.1 Choix des systèmes de production

Plusieurs systèmes de production hétérologues sont envisageables pour les P450s. Les meilleurs taux de production sont obtenus lors de l'expression dans des systèmes procaryotes (E. coli étant l'hôte le plus utilisé) (Estabrook, Mason et al. 1991; Fisher, Caudle et al. 1992). Toutefois ces systèmes nécessitent de supprimer l'ancrage membranaire N-terminal du P450. Ce mode d'expression est préconisé pour les études structurales et spectroscopiques de la protéine.

L'expression peut aussi se faire en milieu eucaryote, principalement sur des cellules d'insectes (Lahde, Raunio et al. 1993) ou sur des lignées cellulaires humaines (Howard, Aoyama et al. 1990) mais les taux de productions associés à ces deux voies restent insuffisants.

La dernière solution est d'opter pour une production dans la levure, autre système eucaryote qui permet à la fois de conserver l'ancrage membranaire N-terminal et d'espérer des taux de productions convenables.

Deux modes de production ont donc été mis au point :

- ❖ une production dans la levure *S. cerevisiae* a été développée pour les tests d'activités enzymatiques d'autant plus que le laboratoire possède une forte expérience dans la production de P450s dans la levure (Peyronneau, Renaud et al. 1992);
- ❖ une expression dans E. coli a été lancée dans l'optique de futures études spectroscopiques et structurales et sera traité en annexe.

III.1.1 Un système eucaryote adapté aux études enzymatiques, la levure *Saccharomyces cerevisiae*

III.1.1.1 Influence de la souche de levure

Au vu de la nécessité d'obtenir de grandes quantités d'enzymes (plusieurs nmoles), de nombreuses cultures de levures exprimant le CYP2U1 ont été entreprises. Ces cultures ont été réalisées sur différentes souches de levure :

1. La souche W(R) surexprimant la P450 réductase de levure,
2. la souche W(hR) surexprimant la P450 réductase humaine,

3. la souche W(N) ne surexprimant pas de réductase. La P450 réductase de levure est toutefois exprimée dans cette souche de façon endogène.

Une description complète des trois souches utilisées est disponible en partie VI.2.3.1 p.164.

Des cultures de levure ayant été transformées par un plasmide vide (plasmide de surexpression du CYP2U1 pour lequel le gène du P450 a été supprimé) ont aussi été effectuées afin de servir de témoin négatif lors des tests biologiques.

Les fractions microsomales contenant le CYP2U1 ont ensuite été isolées selon un protocole détaillé en partie VI.2.2.5 p. 164.

L'activité réductase mesurée pour chacune des cultures correspond à ce qui est généralement obtenu (Peyronneau, Renaud et al. 1992) : une forte activité pour les microsomes issus de souche W(R), une activité moindre pour microsomes dont la souche de levure surexprime la P450 réductase humaine W(hR) et logiquement une faible activité réductase lorsqu'il n'y a pas de surexpression de la réductase W(N).

souche	nombre de cultures	Plasmide	Concentrations ($\text{pmol}_{\text{P450}} / \text{mg}_{\text{protéines}}$)		Taux de production (nmol/L de culture)	Activité réductase *
			min-max	moyenne	moyen	moyenne
W(R)	4	V60-2U1	27-112	81	5.2	1600
W(hR)	19	V60-2U1	39-91	60	3.9	1200
W(N)	4	V60-2U1	50-93	62	4.1	60
W(R)	1	V60-vide	0	0	0	1750
W(hR)	2	V60-vide	0	0	0	1100
W(N)	1	V60-vide	0	0	0	60

Tableau III-1 : Récapitulatif des cultures de CYP2U1 effectuées dans la levure. * : activité en nmol de Cytochrome C réduit par mg de protéine et par minute.

Les taux de productions sont comparables quelle que soit la souche avec néanmoins une meilleure production lorsque la souche W(R) est utilisée. Cependant, seule la souche W(hR) permet d'obtenir une fraction microsomale présentant un spectre différentiel $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}]$ avec une unique bande d'absorption à 450 nm. En effet, lorsque les souches W(R) ou W(N) sont utilisées, le spectre obtenu comporte deux pics : l'un minoritaire à 450 nm et un autre caractérisé par une bande d'absorption à 420 nm. Cette espèce absorbant à 420 nm a été décrite comme une forme inactive du P450 pour laquelle la liaison cystéine fer n'est pas présente.

L'expression du CYP2U1 dans une souche qui surexprime la P450 réductase humaine permet peut être d'obtenir un meilleur couplage entre le P450 humain et sa réductase (elle aussi humaine) lors de la phase d'expression ce qui favoriserait la formation d'une forme active de P450 avec une liaison entre la cystéine et l'atome de fer de l'hème.

L'expression du CYP2U1 dans la levure a donc été effectuée dans des souches de levure surexprimant la P450 réductase humaine – souche W(hR).

III.2 Caractérisation biochimique du cytochrome P450 2U1

La présence du CYP2U1 au sein des fractions microsomales des cultures de levure a été vérifiée. Deux caractérisations ont été entreprises : un dosage spectroscopique de l'hémoprotéine et une caractérisation biochimique via un Western Blot avec une révélation par un anti-corps anti-2U1.

III.2.1 Dosage spectroscopique

La concentration en CYP2U1 est déterminée par spectroscopie différentielle selon la méthode de T. Omura et R. Sato (Omura and Sato 1962). La concentration en CYP2U1 est calculée en mesurant l'absorption à 450 nm du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}]$ formé après réduction de l'hème et ajout de CO. Cependant, il arrive que l'espèce majoritairement observée absorbe à 420 nm (voir Figure III-1, [B]) ce qui correspondrait au complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}]$ pour laquelle la cystéine axiale ne coordine plus le fer de l'hème. Cette situation n'est pas toutefois absolument synonyme d'une forme inactive de l'enzyme. En effet des P450s présentent un signal d'absorption similaire (Bhamre, Anandatheerthavarada et al. 1992) à 420 nm et sont néanmoins catalytiquement actifs.

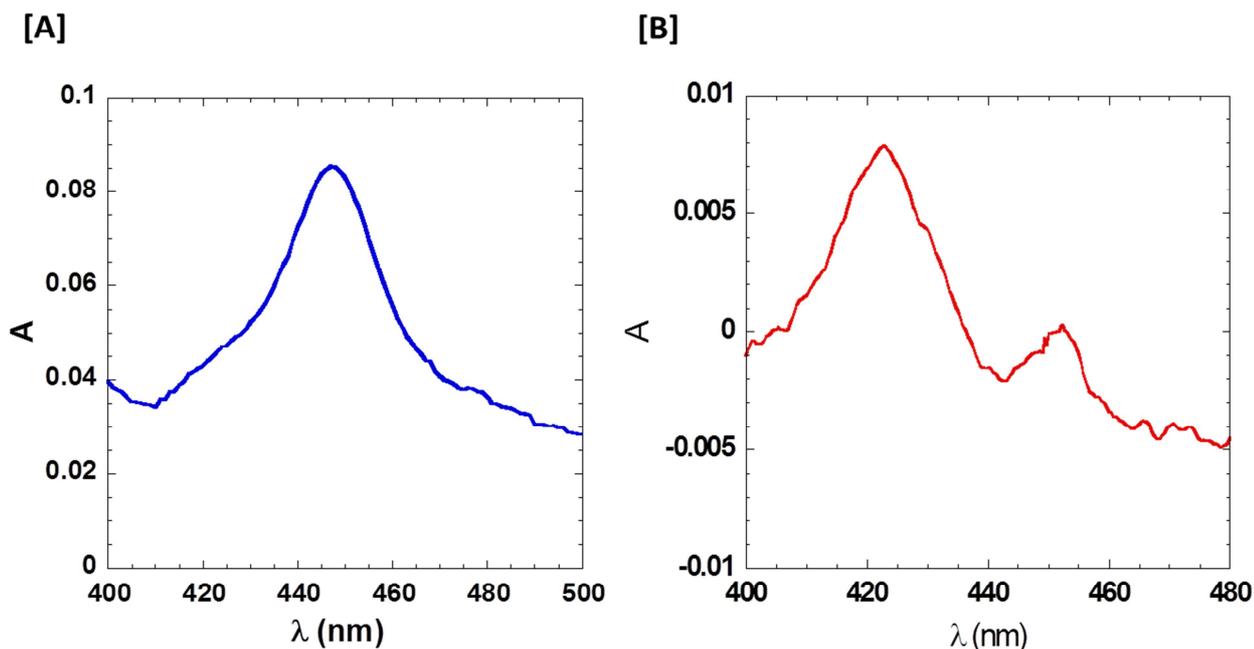


Figure III-1 : Spectre d'absorption différentielle des complexes $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}]$ [A] : Spectre d'absorption différentiel « classique » des P450s obtenue à partir du CYP2U1 exprimé dans la souche W(hR) [B] : Spectre présentant une seconde bande d'absorption à 420 nm caractérisant la présence d'une seconde espèce pour laquelle la liaison cystéine fer est rompue. Spectre obtenu à partir du CYP2U1 exprimé dans la souche W(R).

III.2.2 Immunodétection du CYP2U1 par Western-Blot

Une seconde caractérisation du CYP2U1 passe par la reconnaissance de l'enzyme via un Western Blot. L'anticorps polyclonal nous a été fourni par Magnus Ingelman-Sunberg (Institut Karolinska, Stockholm, Suède). Il a été produit par inoculation chez le lapin d'un peptide spécifique du CYP2U1 correspondant à sa séquence C-terminale (Karlgrén, Backlund et al. 2004). Cet anticorps a déjà été utilisé pour détecter la présence de CYP2U1 dans différents tissus de cerveau humain (Dutheil, Dauchy et al. 2009).

La protéine totale exprimée dans la levure est attendue à 60 kDa et une bande est bien observée pour cette taille de protéine. La caractérisation est confirmée par l'absence de protéine à ce poids moléculaire pour la levure n'ayant pas intégrée le plasmide (visible sur la Figure III-2). L'expression du CYP2U1 est donc confirmée pour les microsomes de levure. Du fait de la nature polyclonale de l'anticorps utilisé, d'autres bandes sont révélées par autoradiographies de la membrane de Western Blot, ce qui correspond à des associations de l'anticorps avec d'autres protéines des microsomes de levure.

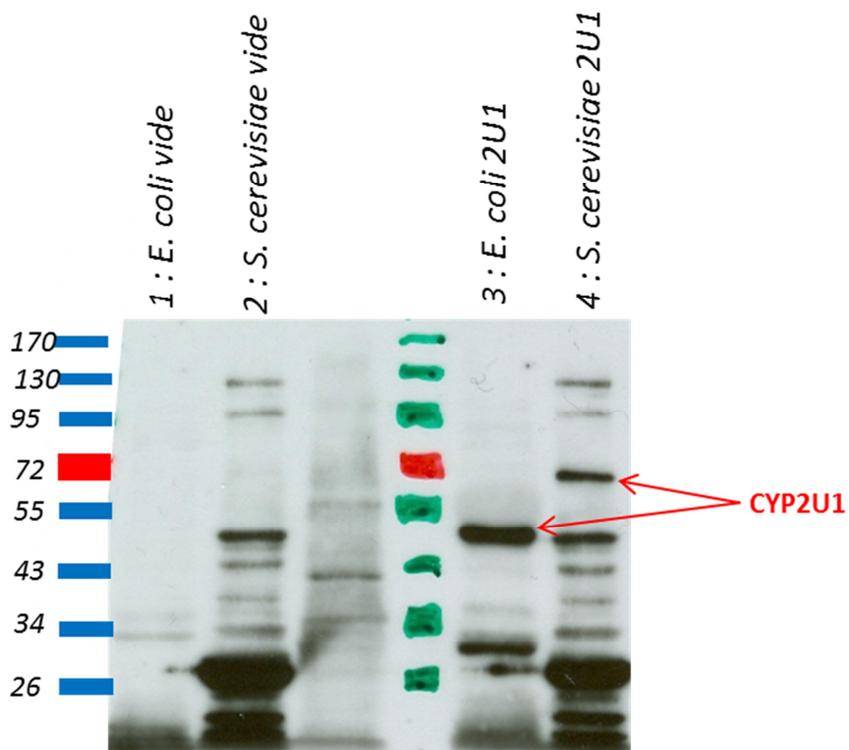


Figure III-2 : Autoradiographie de la membrane du Western Blot. L'expression dans *E. coli* est détaillée en annexe 1 : dépôt d'extrait de *E. coli* transformée par un plasmide pCW vide (ne contenant pas de gène de P450), 2 : dépôt de microsomes de levure transformées par un plasmide V60 vide (ne contenant pas de gène de P450), 3 : dépôt d'extrait d'*E. coli* surexprimant le CYP2U1, 4 : dépôts de microsomes de levure surexprimant le CYP2U1.

III.3 Conclusions

Les études antérieures du CYP2U1 ont été effectuées grâce à des productions de l'enzyme en cellule humaine HEK (Karlgrén, Backlund et al. 2004) ou en cellule d'insecte Sf9 (Chuang, Helvig et al. 2004). Ces systèmes de production ne permettent d'obtenir que de faibles quantités de protéine, quantités insuffisantes pour une recherche d'activité enzymatique.

Au cours de cette thèse deux systèmes d'expression complémentaires du CYP2U1 ont donc été mis au point.

Un premier système d'expression dans la levure *Saccharomyces Cerevisiae* a permis une production d'un complexe de protéines membranaires CYP2U1-P450 réductase catalytiquement actif. Les taux d'expression de ces deux protéines dans la levure sont modestes mais largement suffisants pour permettre des études de recherche de substrat. C'est d'ailleurs avec ces-mêmes microsomes de levures surexprimant le CYP2U1 que seront pratiqués les tests d'activités pour la recherche de nouveaux substrats au CYP2U1 (chapitre suivant).

Le second système d'expression dans la bactérie *E. coli* est décrit en annexe. Il permet d'obtenir de plus grandes quantités d'enzyme soluble (forme tronquée de la protéine). L'optimisation des conditions de culture a été entreprise en vue de la production d'une forme active de la protéine. Il reste à entreprendre une purification complète du CYP2U1 dans ce système de production afin d'envisager des études structurales (cristallisation et étude rayons X). A ce jour, nous avons toutefois confirmé que le CYP2U1 produit dans *E. coli* possède les mêmes propriétés catalytiques que sa forme membranaire exprimée dans la levure.

CHAPITRE IV.

VERS DE NOUVEAUX SUBSTRATS DU CYP2U1

IV.1 Quels substrats pour un CYP orphelin ?

IV.1.1 Méthodologie

Hormis une activité d'hydroxylation en position ω et $\omega-1$ d'acides gras à longues chaînes tels que l'acide arachidonique, l'EPA ou la DHA (Chuang, Helvig et al. 2004), aucune activité enzymatique du CYP2U1 n'était connue lors du lancement de ce projet de thèse

Afin de trouver de nouveaux substrats pour cette enzyme, nous avons opté pour une stratégie dirigée et avons utilisé comme substrats potentiels des molécules connues pour être transformées par d'autres P450s, principalement ceux de la même famille 2. De plus, nous nous sommes principalement concentrés sur les substrats des P450s les plus proches d'un point de vue phylogénétique à savoir les CYP2J2, 2D6 et 2R1 ainsi que sur les substrats présents de manière endogène dans le cerveau.

Les tests d'activité ont été effectués par incubation de microsomes de levures surexprimant le CYP2U1, en présence ou absence de cofacteur NADPH et de substrat potentiel (à une concentration de 200 μ M). La recherche d'éventuels produits de métabolisme s'est ensuite faite le plus souvent par une analyse de l'incubat par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse (CLHP-SM).

IV.1.2 Liste des molécules testées

A ce jour, une librairie de plus de soixante-dix substrats potentiels (présentés dans le Tableau IV-1) a été testée comprenant à la fois des molécules endogènes mais aussi différents exogènes (le plus souvent des principes actifs de médicaments). A chaque fois que cela était possible, une incubation contrôle en présence de l'isoforme de P450 transformant le substrat potentiel a été effectuée afin de s'assurer à la fois de la validité du test enzymatique et de la méthode de détection des produits de métabolisme.

En pratique, lorsque l'analyse de l'incubat se fait par spectrométrie de masse, nous recherchons d'éventuels produits de métabolisme qui présenteront un rapport m/z augmenté de 16 unités par rapport à celui du substrat. Ceci traduit l'ajout d'un atome d'oxygène au substrat lors de réactions d'hydroxylation ou d'époxydation, principales réactions catalysées par les P450s. Lorsque l'activité caractéristique associée au substrat est différente d'une hydroxylation (par exemple la O-

déméthylation de la codéine catalysée par le CYP2D6), nous recherchons aussi les produits de métabolismes associés à cette réaction (et donc, pour notre exemple, un produit de métabolisme caractérisé par un rapport m/z inférieur de 14 unités à celui de la codéine).

Molécule testée	Activité caractéristique	isoforme contrôlé	Référence
Endogènes			
Anandamide	Hydroxylation en position 20	2D6	(Sridar, Snider et al. 2011)
Acide arachidonique	Hydroxylation en position 11, 13 et 15	2C9	(Bylund, Ericsson et al. 1998)
D-erythro-ceramide-C8	Hydroxylation en position 16	2C9	(Nakayama, Arai et al. 1967)
D-erythro-Dihydrosphingosine			
D-erythro-dihydrosphingosine 1-phosphate			
DHA ¹			
DHEA ² Sulfate			
Dihydroceramide C8			
Dopamine			
D-Sphingosine			
EPA ³			
Mélatonine			
L-threo-Dihydrosphingosine	Hydroxylation en position 6, N-Dealkylation	1A2, 2C9	(Facciola, Hidestrand et al. 2001)
Nortriptyline	Hydroxylation en position 10	2D6	(Olesen and Linnet 1997)
Sérotonine	Deamination	3A4, 2D6	(Yu, Granvil et al. 2003)
Tryptamine		2D6	
Vitamine D3		2R1	
Exogènes			
Codéine	O-déméthylation	2D6	(Mortimer, Persson et al. 1990)
Lidocaïne	Hydroxylation en position 3	2D6	(Nyberg, Mann et al. 1996)
Thébaïne	O-déméthylation	2D6	(Mikus, Somogyi et al. 1991)
4-méthyl coumarine	Hydroxylation en position 7	3A4, 2C9	(Lake 1999) ^(a)
7-ethoxycoumarine	O-deethylation	2B1	(Fang, Kobayashi et al. 1997)
Albendazole	Hydroxylation aliphatique	2J2, 3A4	(Lee, Neul et al. 2010)
Amiodarone	Hydroxylation aliphatique	2J2, 3A4	(Lee, Neul et al. 2010)
Atomoxetine	Hydroxylation en position 4	3A4, 2D6	(Ring, Gillespie et al. 2002)
Bosutinib		3A4	(Abbas, Hug et al. 2011)
Butyryl CoEnzymeA			
Capsaïcine	O-demethylation, ...	2E1, 2C9	(Reilly and Yost 2006)
Carnetinib		PB	
5-methoxyindolethylamine	O-déméthylation	3A4, 2D6	(Yu, Idle et al. 2003)
Coumarine	Hydroxylation en position 7	2A6	(Pearce, Greenway et al. 1992)
Danazol	Hydroxylations	2J2, 3A4	(Lee, Neul et al. 2010)
Débrisoquine	Hydroxylation en position 4	2D6	(Malcolm and Marten 1976)
Dextromethorphan	Hydroxylation en position 3	2D6, 3A4	(Yu and Haining 2001)
Dihydroxycapsaïcine	O-demethylation, ...	2E1, 2C9	(Reilly and Yost 2006)
Ebastine	Hydroxylation aliphatique	2J2/3A4	(Hashizume, Imaoka et al. 2002)
Erlotinib	O-demethylation, ...	3A4	(Ling, Johnson et al. 2006)
Ethylterféfadone	Hydroxylation aliphatique	2J2	(Lafite, Dijols et al. 2006)
Gefitinib		PB	
Imatinib		PB	
Lapatinib		PB	
3,5-diméthyladamantane-1-amine	Hydroxylation en position 4 et 6	2D6	(Lundbeck 2002)

¹ acide docosahexaénoïque

² dehydroépiandrosterone

³ acide éicosapentaénoïque

Nortriptyline	Hydroxylation, déméthylation	2D6	(Olesen and Linnet 1997)
Octanoyl CoEnzymeA			
Omeprazole	Hydroxylation	3A4, 2C19	(Andersson, Miners et al. 1993)
Paracetamol (4-acetaminophenol)	N-hydroxylation	2E1	(Patten, Ishizaki et al. 1992)
Paranitrophénol			
Substrat P450-Glo® 2D6	O-demethylation	2D6	(Cali, Sobol et al. 2005) ^(b)
Substrat P450-Glo® 2J2	O-demethylation	2J2	(Cali, Sobol et al. 2005) ^(b)
Terfénadine	Hydroxylation aliphatique	2J2/3A4	(Stresser, Broudy et al. 2004)
Tomoxetine	Hydroxylation en position 4	2D6	(Ring, Gillespie et al. 2002)

Tableau IV-1 : Liste des molécules testées comme substrat potentiel du CYP2U1. Méthode de détection : toutes les incubations ont été analysées par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse sauf (a) : détection par luminescence (Cali, Sobol et al. 2005) et (b) : chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par fluorimétrie. PB : microsomes de foie de rat traités au phénobarbital.

La recherche de substrat au CYP2U1 est cependant soumise à deux limites : la sensibilité de la détection des produits de métabolisme et les conditions d'incubation.

1. La spectrométrie de masse (utilisée pour la quasi-totalité des analyses d'incubation) offre une sensibilité de détection assez fine. Ainsi on estime qu'il est possible de détecter des produits de métabolisme à des concentrations de l'ordre de 0.5 μM . En deçà de ce seuil, les éventuelles activités ne sont pas détectables.
2. Nous avons choisi une concentration en substrat relativement élevée (200 μM). Avec ce choix, si l'affinité pour le substrat est très faible (K_M supérieur à 100 μM) il ne sera pas possible de caractériser ces activités.

Sur les 70 substrats potentiels testés, **des produits de métabolisation ont été détectés** pour deux molécules **la débrisoquine et l'éthylterfénadone**.

Dans les deux parties suivantes, nous effectuerons une étude plus poussée de ces **deux premières activités du CYP2U1 sur des composés exogènes** avec la caractérisation des produits de métabolisme, de la cinétique, l'étude de la transformation d'analogues de ces molécules et des expériences d'arrimage de ces substrats au sein du site actif du CYP2U1 à l'aide des modèles précédemment décrits.

IV.2 Métabolisme de la débrisoquine par le CYP2U1

La débrisoquine (3,4-dihydro-2(1H)-isoquinoline carboxamide) est un dérivé de la guanidine qui fut utilisé comme antihypertenseur (Abrams, Pocelinko et al. 1964; Luria and Freis 1965). Cette molécule est connue pour être transformée par le CYP2D6 en plusieurs métabolites et c'est l'une des

premières drogues qui a permis la mise au jour du polymorphisme génétique associé aux P450s chez l'homme (Inaba, Otton et al. 1980). Elle est d'ailleurs aujourd'hui encore utilisée pour le phénotypage du CYP2D6 (Fuhr, Jetter et al. 2007) . La débrisoquine est d'ailleurs préconisée par l'agence américaine du médicament (FDA) comme outil de phénotypage.

Le métabolisme de phase I de la débrisoquine a été amplement étudié chez l'homme et le rat avec l'identification de ses produits de métabolisme dans les urines (Vincent-Viry, Deshayes et al. 1988; Lightfoot, Ellis et al. 2000). La 4(S)-hydroxy débrisoquine est le produit d'oxydation retrouvé majoritairement dans les urines (Lanz, Theurillat et al. 1997), accompagnée d'autres produits de métabolisation excrétés en plus faibles quantités : les phénols (hydroxylation en position 5, 6, 7 et 8). Plus récemment, un produit de déshydratation probablement issu de la 4 hydroxydébrisoquine – la 3,4 dehydrodébrisoquine – a aussi été détecté (Zhen, Slanar et al. 2006). Des produits d'ouverture issus des 1- et 3-hydroxydébrisoquines sont aussi excrétés dans les urines aussi bien chez l'homme que chez le rat (Eiermann, Edlund et al. 1998). Enfin, un produit de N-hydroxylation a parfois été isolé (Clement, Schultze-Mosgau et al. 1993). Toutes ces voies de métabolisme sont illustrées par la Figure IV-1.

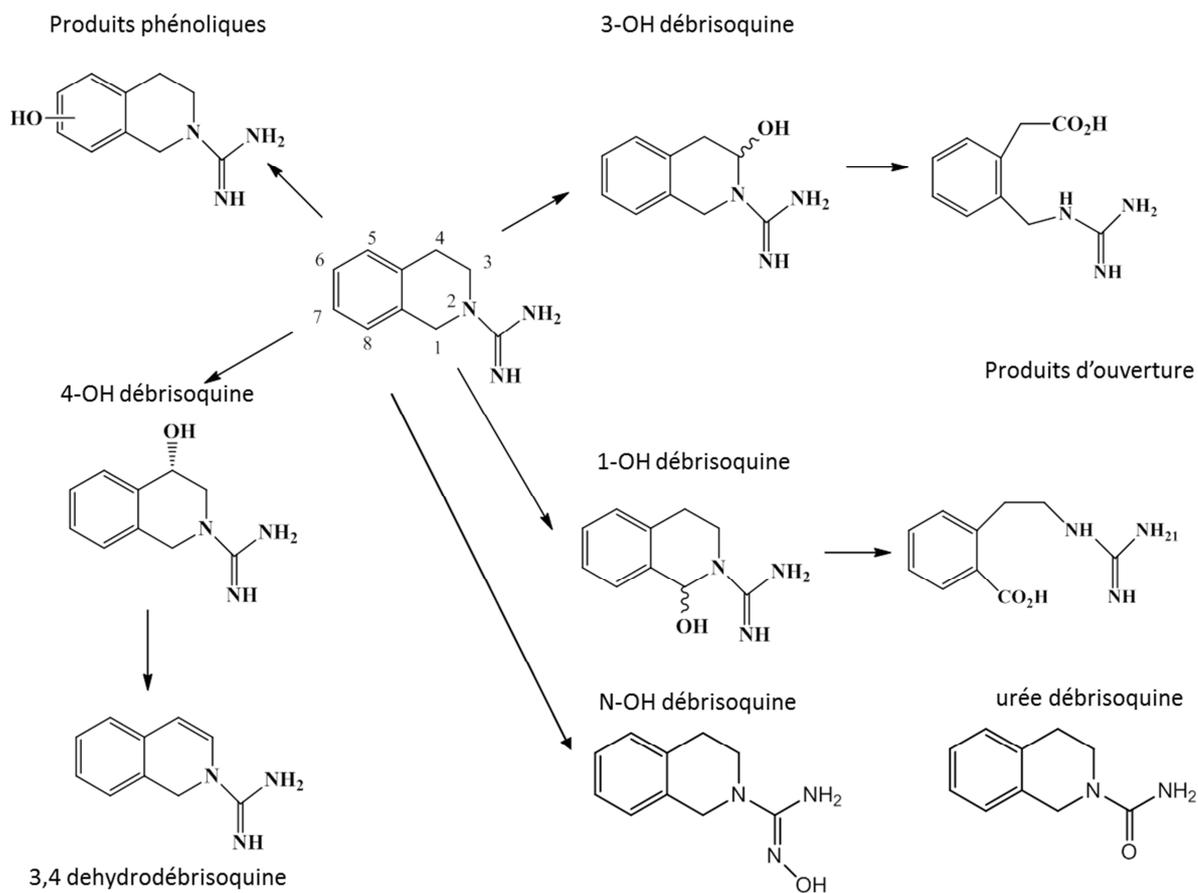


Figure IV-1 : Nomenclature et principales voies de métabolisme de la débrisoquine

IV.2.1 Régiosélectivité d'oxydation par le CYP2U1

Les analyses des produits issus d'incubations de la débrisoquine avec des microsomes de levure exprimant le CYP2U1 et en présence de NADPH montrent l'apparition de trois pics en CLHP/SM correspondant à des dérivés hydroxylés de la débrisoquine (ions à m/z 192) :

- **M1** élue à un temps de rétention de **11.2 min** et correspond à $11 \pm 2\%$ du total des produits d'hydroxylation
- **M2** élue à un temps de rétention de **13.8 min** et correspond à $21 \pm 2\%$ du total des produits d'hydroxylation
- **M3** élue à un temps de rétention de **16.0 min** et correspond à $68 \pm 2\%$ du total des produits d'hydroxylation

Des incubations en absence de co-facteur NADPH ou en absence de CYP2U1 (et en présence de microsomes de levure transformée par un plasmide "vide") ne permettent pas la formation de ces métabolites. De même, aucune activité n'est décelée après l'ajout de 1 mM de benzyl-imidazole ou de 100 μ M de clotrimazole, deux inhibiteurs de P450s. Enfin, dans nos conditions, aucun produit présentant un rapport m/z de 208, caractéristique de produits de suroxydation (diol ou acide carboxylique) n'a été détecté.

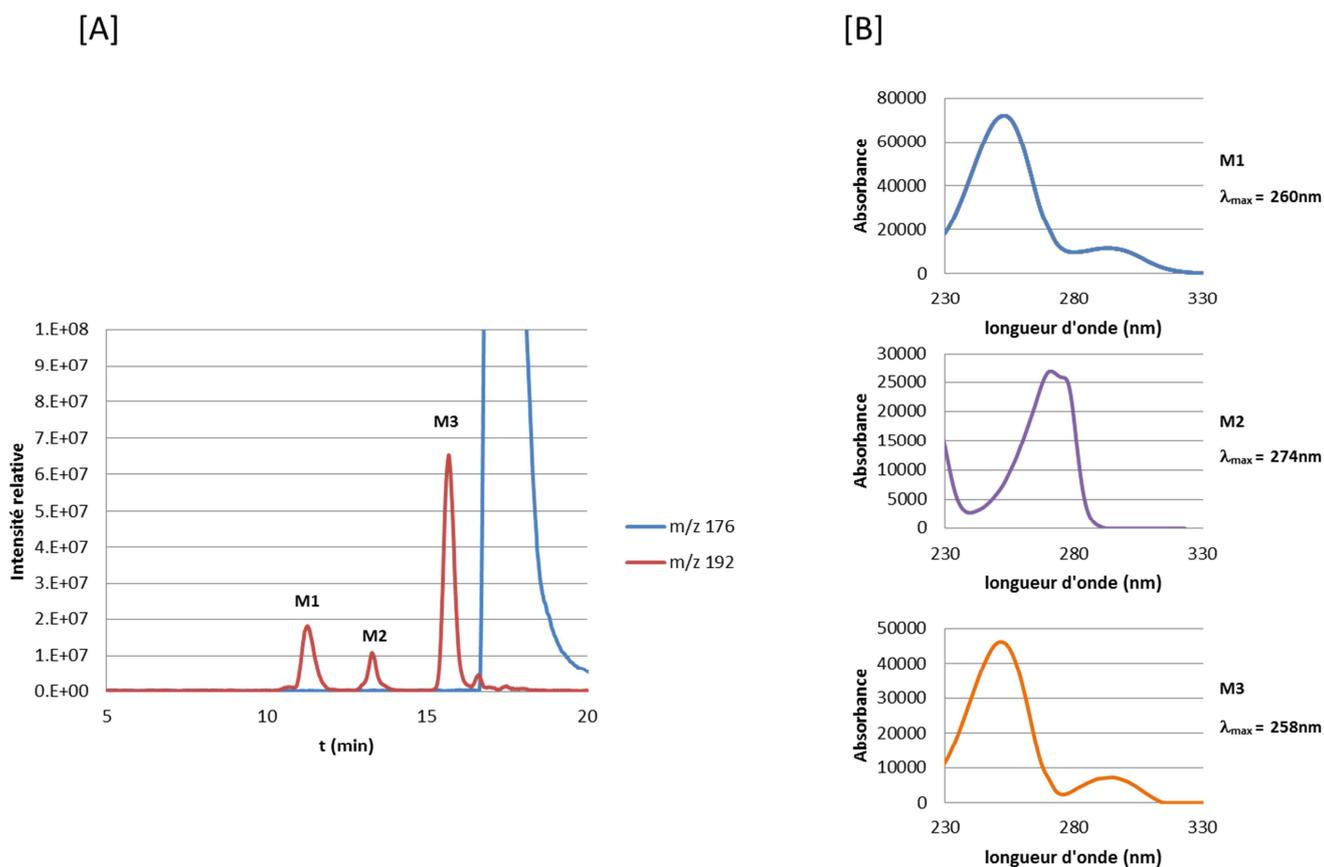


Figure IV-2 : [A] : Chromatogramme CLHP/SM (mode ESI+) obtenu après incubation de la débrisoquine avec le CYP2U1. Les ions détectés au rapport m/z 192 correspondent aux hydroxydébrisoquines, ceux à m/z 176 à la débrisoquine. **[B] : Spectres UV-visible des 3 métabolites de type hydroxydébrisoquine formée par le CYP2U1.**

Il nous a alors été nécessaire de caractériser les métabolites formés par le CYP2U1.

Les produits d'hydroxylation de la débrisoquine ont été identifiés par leur temps de rétention, leurs spectres de masse et leurs spectres d'absorption UV-visible en comparaison avec les métabolites authentiques disponibles (4, 5, 6, 7, 8 et N-hydroxydébrisoquine, urée débrisoquine).

Molécule	Temps de rétention (min)	λ_{max} (nm)
4-OH débrisoquine	11.2	260
5-OH débrisoquine	12.6	271
6-OH débrisoquine	13.8	274
7-OH débrisoquine	14.2	270
8-OH débrisoquine	15.7	271
N-OH débrisoquine	16.6	262
débrisoquine	17.3	261
urée débrisoquine	17.6	258

Tableau IV-2 : Temps de rétention et longueur d'onde d'absorption maximale de la débrisoquine et de ses produits d'hydroxylation authentiques.

Il est d'abord possible de différencier les phénols des autres alcools par leurs caractéristiques spectrales : les spectres d'absorption UV-visibles des phénols sont identiques entre eux avec un maximum d'absorption à 272 ± 3 nm alors que les alcools aliphatiques absorbent avec un maximum à 260 ± 3 nm (voir Tableau IV-2). L'étude des produits de fragmentations MS² des alcools ne permet pas, quant à elle, de différencier les produits d'hydroxylation : tous les alcools génèrent les trois mêmes produits de fragmentation (m/z 132, 150 et 174) qui sont répertoriés en Figure IV-3. Le fragment présentant un rapport m/z de 174 correspond à la perte du groupement OH, celui avec un m/z de 150 est l'ion formé après la perte de la guanidine et le dernier fragment est issu de la perte conjointe de l'alcool et de la guanidine .

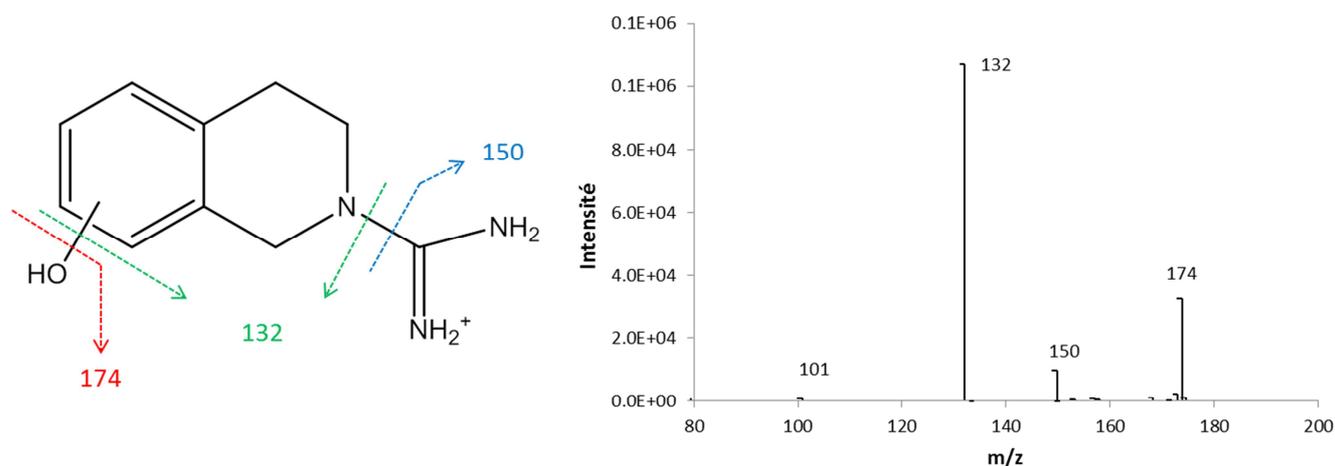


Figure IV-3 : Spectre de fragmentation MS² des hydroxydébrisoquine et assignation structurale des trois principaux fragments (ici le spectre de fragmentation est celui de la 4-hydroxydébrisoquine, il est identique en tout point à ceux des 4 et 6-hydroxydébrisoquine).

Les deux premiers produits d'hydroxylation de la débrisoquine par le CYP2U1 éluant aux temps de rétention 11.2 min (**M1**) et 13.8 min (**M2**) ont été identifiés comme étant les 4 et 6-hydroxydébrisoquine respectivement, par comparaison aux spectres de masse et UV-visible des authentiques (voir Figure IV-2). Le troisième produit d'hydroxylation (**M3**) n'a pas pu être identifié directement : il ne correspond pas à l'un des produits authentiques disponibles. Toutefois, son spectre de fragmentation MS² ainsi que son spectre d'absorption UV-visible sont caractéristiques des produits d'hydroxylation aliphatique de la débrisoquine, il s'agit donc de la 1 ou la 3-hydroxydébrisoquine.

L'identification du troisième produit de métabolisme a été rendue possible par l'étude de la métabolisation de la débrisoquine par les microsomes de foie de rat induit au phénobarbital (PB). En effet, ceux-ci forment en grandes quantités, le même produit d'hydroxylation aliphatique que le CYP2U1 éluant au même temps de rétention et présentant les mêmes spectres UV et de masse. Une incubation de 10 mg de débrisoquine en présence de microsomes de foie de rat PB et de NADPH a permis d'obtenir une quantité suffisante de ce métabolite pour une identification par RMN du proton (après purification du produit par chromatographie semi-préparative).

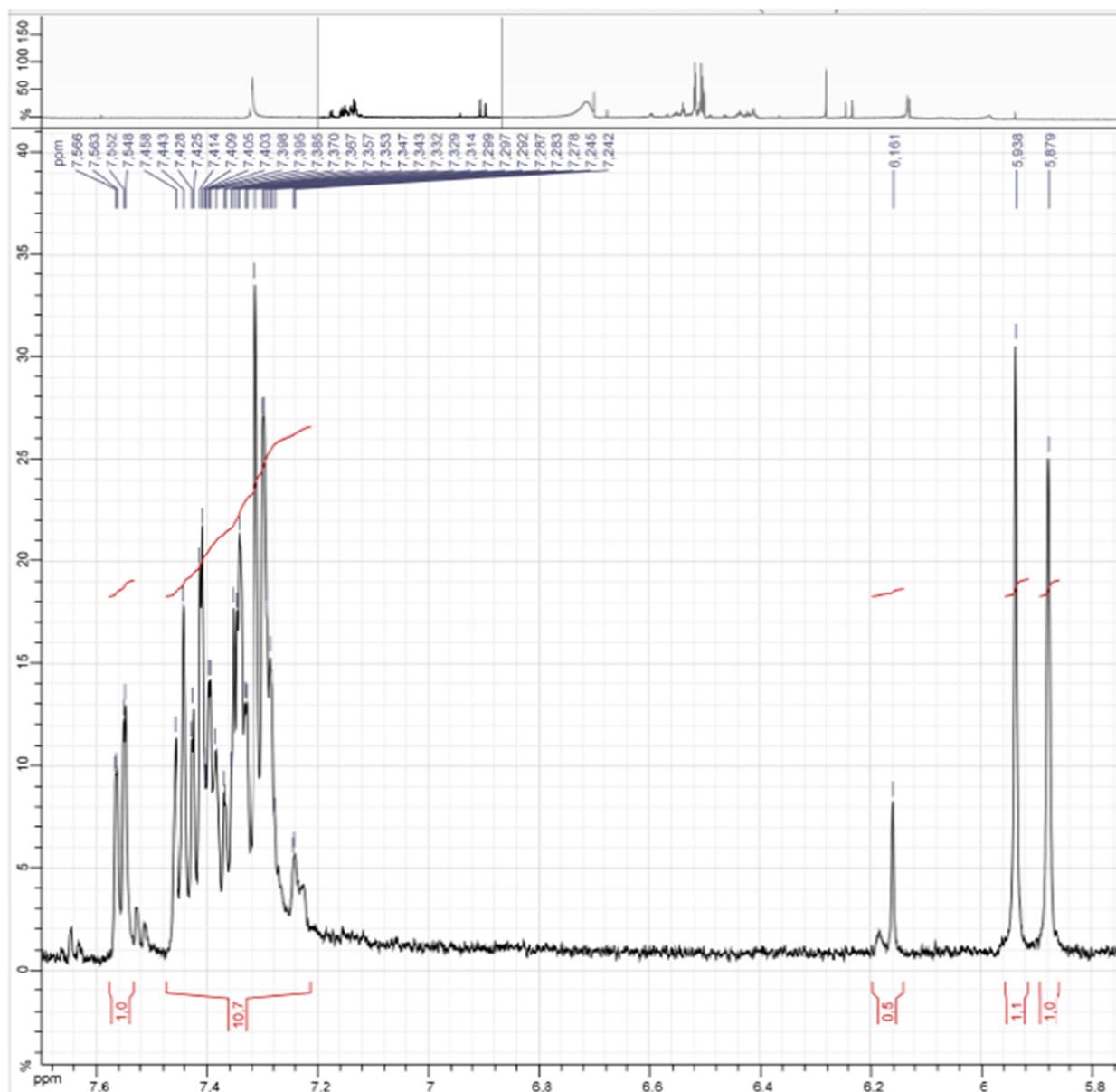


Figure IV-4 : Spectre RMN du produit d'hydroxylation de la débrisoquine . Seule la région 5.8-7.7ppm est représentés

L'attribution des signaux faite grâce à une expérience TOCSY. Ce spectre fait apparaître la présence de deux isomères en proportions identiques.

isomère a : δ 3.04 (m, H4b), 3.12 (m, H4a), 3.54 (d, H3a + H3b), 5.87 (s, H1), 7.34 (d, H5), 7.39 (dd, H7), 7.41 (dd, H6), 7.56 (dd, H8); **isomère b :** 2.97 (m, H4b'), 3.13 (m, H4a'), 3.59 (m, H3b'), 3.80 (dd, H3a'), 5.94 (s, H1), 7.29-7.32 (m, H5', H6', H7'), 7.45 (dd, H8').

De plus, le spectre de ce nouveau métabolite diffère à la fois de celui de la 4-hydroxydébrisoquine avec l'absence du signal caractéristique des deux protons en position 1 (δ 4.15 et 4.92 ppm) mais aussi

de celui de la 3-hydroxydébrisoquine décrit par T. Hiroi (Hiroi, Chow et al. 2002) et dont les protons aliphatiques sont caractérisés par des signaux à 5.6, 4.4 et 3.1 ppm.

A la fois, les déplacements chimiques, les constantes de couplage et de corrélation sont compatibles avec une fonction alcool en position 1.

Le spectre RMN indique la présence de deux conformères. Cette observation nous a amené à faire une étude conformationnelle de la 1-hydroxydébrisoquine qui a révélé la présence de deux isomères en équilibre (pour chaque énantiomère - voir Figure IV-5). Ces deux conformères diffèrent par la présence ou l'absence de liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction alcool et la guanidine. Cependant, l'écart en énergie mesuré entre ces deux conformères est très faible ($1.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ceci peut s'expliquer par le fait que la stabilisation due à la formation de la liaison hydrogène dans l'un des isomères est compensée par une forte tension de cycle (énergétiquement défavorable) dans cette même molécule. Ce faible écart énergétique est compatible avec les proportions observées par RMN pour chaque isomère.

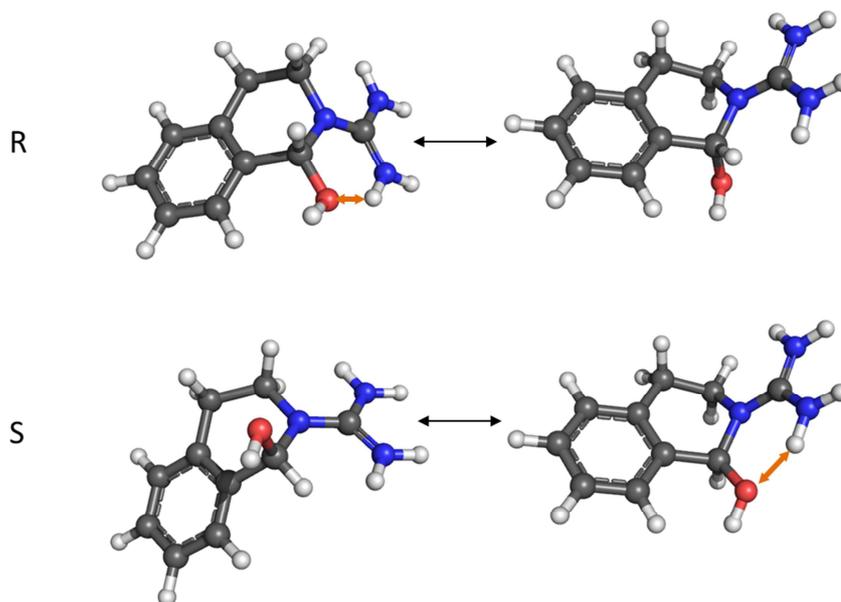


Figure IV-5 : Equilibres conformationnels de la 1-hydroxydébrisoquine. Les atomes sont représentés par des sphères de couleur, les liaisons par des bâtons, les liaisons hydrogènes par une double flèche orange.

Ainsi, le dernier produit formé par le CYP2U1 (M3) a été identifié comme la 1-hydroxydébrisoquine.

Un premier substrat exogène du CYP2U1 a donc été caractérisé. La régiosélectivité d'hydroxylation de la débrisoquine par le CYP2U1 est différente de celle observée avec le CYP2D6 : le produit d'hydroxylation majoritairement formé est la 1-hydroxydébrisoquine. Il est alors nécessaire d'effectuer une étude approfondie du métabolisme de la débrisoquine par le CYP2U1.

IV.2.2 Cinétique d'hydroxylation de la débrisoquine par le CYP2U1

La cinétique d'hydroxylation de la débrisoquine a ensuite été caractérisée. La quantification des produits d'hydroxylation a été effectuée grâce à une détection en spectrométrie de masse. Les concentrations en alcools formés ont été estimées grâce à un étalonnage avec la 4-hydroxydébrisoquine.

L'activité catalytique du CYP2U1 est constante pendant un peu plus de 10 minutes (linéarité de la courbe en Figure IV-6 [A]). Après ce laps de temps, l'activité décroît progressivement. Cette inactivation progressive de l'enzyme est classiquement observée pour les P450s surexprimés en système hétérologue.

D'autre part l'activité observée est bien dépendante de la concentration en CYP2U1 comme le montre la Figure IV-6 [B].

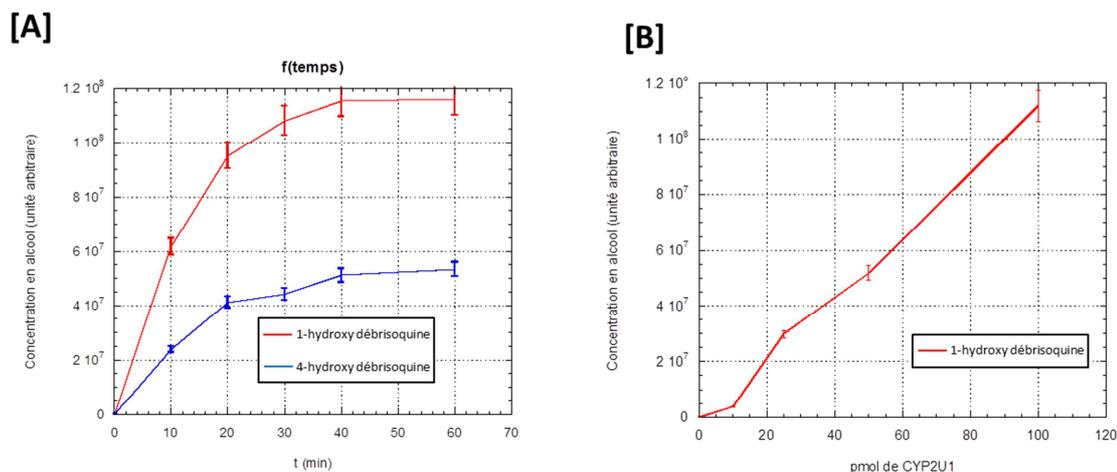


Figure IV-6 : [A] : influence du temps d'incubation sur la métabolisation de la débrisoquine. Incubations effectuées en présence de $0.25 \mu\text{M}$ de CYP2U1, de $100 \mu\text{M}$ de substrat et de 1 mM de NADPH à une température de 28°C . La faible concentration en 6-hydroxydébrisoquine n'a pas pu être quantifiée [B] : **influence de la quantité d'enzyme sur la métabolisation.** Incubations effectuées en présence de $100 \mu\text{M}$ de substrat, NADPH 1 mM , à 28°C

L'effet de la concentration en débrisoquine sur l'activité du CYP2U1 a aussi été étudié (exemple donné pour l'activité 1-débrisoquine hydroxylase illustré en Figure IV-7). Ce travail a permis de

caractériser l'affinité de la débrisoquine avec le CYP2U1 avec la mesure de la constante de Mickaelis (K_M) pour les trois activités hydroxylases (données dans le Tableau IV-3).

Les valeurs de constante associée au CYP2U1 (entre 360 et 480 μM) sont relativement élevées au regard des constantes mesurée pour le CYP2D6 (de l'ordre de la dizaine de μM). La débrisoquine possède donc une affinité plus faible pour le CYP2U1 que pour le CYP2D6.

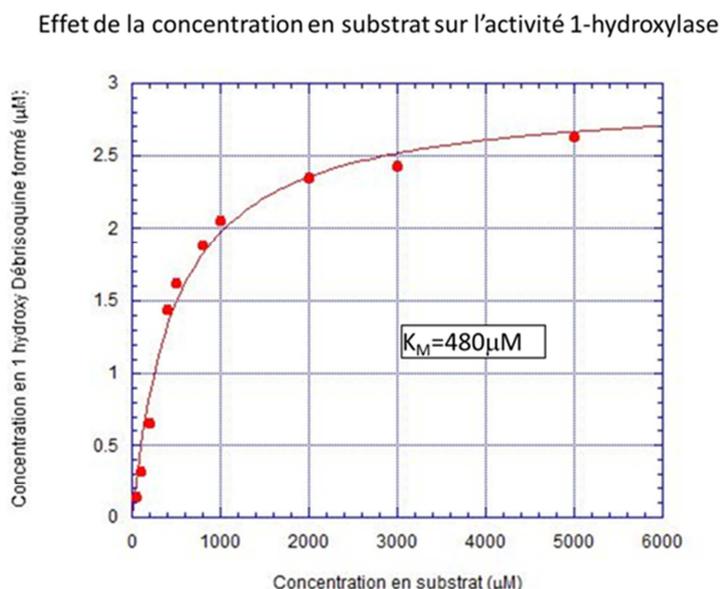


Figure IV-7 : Calcul de K_M de la débrisoquine pour l'activité de 1-hydroxylation. Incubations dans un volume de 200 μL en présence de 25 pmol d'enzyme sur une durée de 15 min.

isoforme	position d'hydroxylation	K_M (μM)	V_M (min^{-1})
CYP2U1	1	480 ± 20	0.5 ± 0.05
	4	360 ± 20	0.3 ± 0.05
	6	470 ± 20	0.2 ± 0.05
CYP2D6	4	$12^a - 50^b$	1.5^d
	6	12.2^c	0.8^d

Tableau IV-3 : Comparaison des K_M d'hydroxylation de la débrisoquine. a: (Granvil, Krausz et al. 2002) , b: (Krynetski, Drutsa et al. 1995), c: (Lightfoot, Ellis et al. 2000) ,d: (Ellis, Hayhurst et al. 2000)

L'activité hydroxylase observée est spécifique à la débrisoquine : une série de six molécules chimiquement proches de la débrisoquine ont été testées sans succès (structures présentés en Figure

IV-8). Outre la présence d'une fonction guanidine (absente sur les molécules 1 à 3) et d'un domaine hydrophobe, la présence du deuxième cycle aliphatique (absent sur les analogues 5 et 6) semble donc nécessaire à l'activité. De plus, l'augmentation du volume du substrat par l'ajout de groupements méthoxy (molécule 4) entraîne la perte de l'activité catalytique.

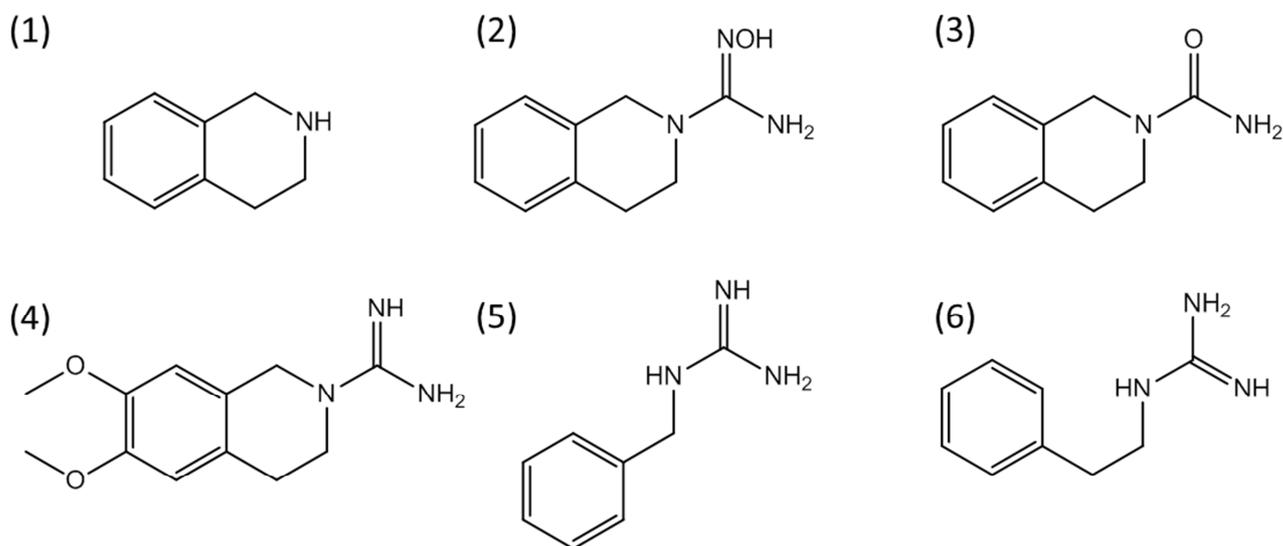


Figure IV-8 : Analogues de débrisoquine. (1) : 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline, (2) : N-hydroxydébrisoquine, (3) : urée débrisoquine, (4) : 6,7-diméthoxydébrisoquine, (5) : benzyl guanidine, (6) : phénéthyl guanidine

IV.2.3 Activités comparées de divers P450 humains

Le fait que la 1-hydroxydébrisoquine soit le produit principal formé par le CYP2U1 a de quoi surprendre. En effet, ce produit n'a jamais été décrit, à notre existence, comme métabolite de la débrisoquine. Son existence a été postulée, ainsi que celle de la 3-hydroxydébrisoquine, après caractérisation dans les urines, des acides résultants de la suroxydation des alcools intermédiaires. Nous avons donc voulu répondre à une question : cette régiosélectivité d'oxydation est-elle alors une spécificité du CYP2U1 ou alors est-ce que d'autres isoformes sont capables de générer de la 1-hydroxydébrisoquine ?

Pour ce faire l'activité débrisoquine hydroxylase ainsi que la régiosélectivité d'hydroxylation ont été déterminées pour divers P450s humains. Les résultats sont présentés au Tableau IV-4 pour lequel les activités 1 et 3 hydroxylases sont regroupées en une unique colonne (de même que pour la formation des phénols) du fait de la difficulté à séparer ces produits formés.

L'activité mesurée dépend amplement de l'isoforme considéré : le CYP2D6 et 1A1 présentent les taux de conversion de la débrisoquine (rapport entre la concentration en métabolites formés et

concentration initiale en substrat) les plus importants, les isoformes de la famille 3A eux aussi transforment la débrisoquine mais à un taux deux fois moindre que le CYP2D6. Les CYP2B6 et 2E1 présentent quant à eux, une activité moindre alors que les CYP2J2, 2C8 et 2C9 sont inactifs. Le CYP2D6 n'est donc pas le seul isoforme à pouvoir transformer la débrisoquine en produits d'hydroxylation.

La régiosélectivité d'hydroxylation observée est aussi surprenante. Premièrement, la 4-hydroxydébrisoquine est bien le produit majoritaire issu de l'incubation en présence de CYP2D6 mais, plus surprenant, les autres positions aliphatiques sont elles aussi réactives vis—vis du CYP2D6 et les produits formés (1 et 3-hydroxydébrisoquine) représentent 10% du totale des produits d'oxydations alors que ces produits n'avaient jamais été détectés dans de telles proportions jusqu'à lors. Pour les autres isoformes, la régiosélectivité est similaire à celle observée pour le CYP2U1 avec les 1- et 3-hydroxydébrisoquines majoritaires (46-84%), devant la 4-hydroxydébrisoquine (16-29%) et les phénols.

CYP450 *	% Total métabolites ¹	% 1 et 3-OH- débrisoquine ²	% 4-OH- débrisoquine ²	% 5-, 6-, 7-, 8-OH- débrisoquine ²
Foie Humain	1.3	21.4	42.2	36.4
1A1	2.8	59	29	11
2B6	0.13	65	0	34
2C8	< 0.05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
2C9	< 0.05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
2D6	2.8 ± 0.5	10 ± 4	40 ± 2	50 ± 5
2E1	0.14	64	0	36
2J2	< 0.05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
2U1	1.0	68 ± 2	21 ± 2	11 ± 2
3A4	0.9	84	16	0
3A5	1.5	46	22	32

Tableau IV-4 : Activité et régiosélectivité d'hydroxylation de la débrisoquine catalysée par différents P450 humains recombinants et par des microsomes de foie humains. Origine des P450s détaillée en partie Protocoles Expérimentaux p. 167. Conditions: 5 mM débrisoquine, 30 min à 37°C, activités mesurées par CLHP et détection fluorimétrique. 1 : % total en produits d'hydroxylation déterminé en fluorimétrie par rapport à la débrisoquine. n.d. : non déterminé 2 : % des produits d'hydroxylation

Au vue de la régiosélectivité d'oxydation de la débrisoquine par différents isoformes de P450s humains et surtout par des microsomes de foie humain, l'hydroxylation de la position 1 et 3 de la débrisoquine est certes secondaire (par rapport à l'hydroxylation en position 4 majoritaire) mais non négligeable. Elle correspond à 21% des produits d'hydroxylation lors d'incubations en présence de microsomes de foie humains. Ces 21 % correspondraient bien aux mélanges d'acides observés dans les urines et issus des 1 et 3-hydroxydébrisoquines (Eiermann, Edlund et al. 1998).

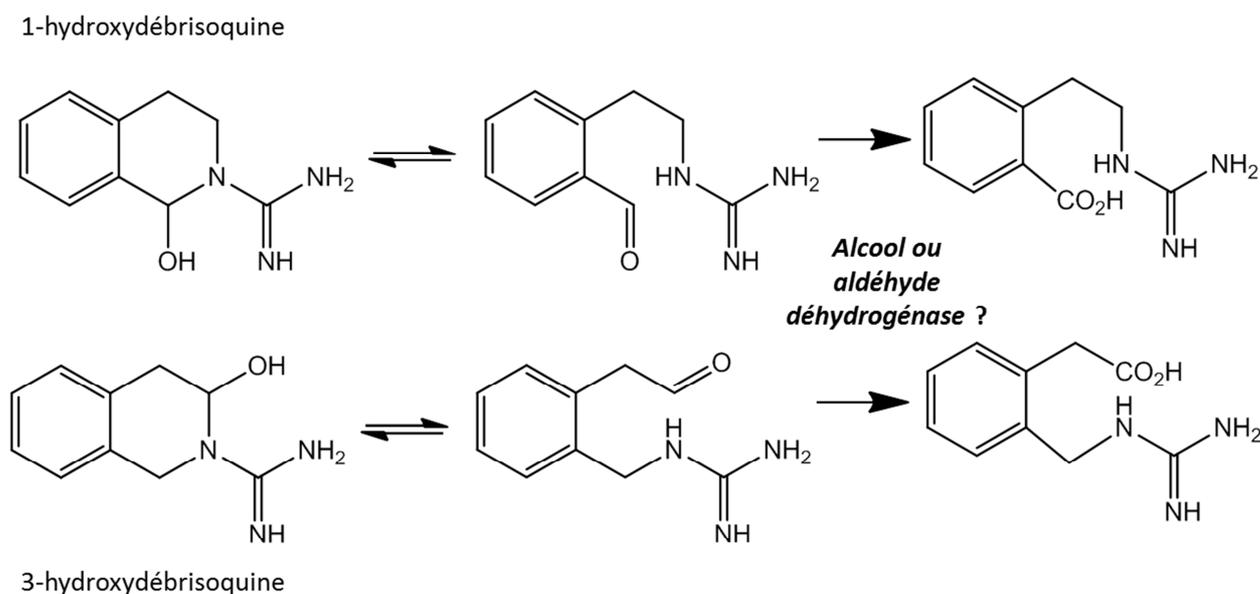


Figure IV-9 : Voie possible de suroxydation des 1 et 3-hydroxydébrisoquines. Les 1 et 3-hydroxydébrisoquine correspondent à des structures fermées de semi-aminal pouvant être en équilibre avec une forme amino aldéhyde ouverte. L'aldéhyde pouvant ensuite être oxydé en acide carboxylique.

En conséquence, il est fort possible que ces produits d'oxydation (1 et 3-hydroxydébrisoquine) ne soient pas stables *in vivo* et ils doivent donc être pris en charge par un autre système enzymatique (non P450) pour former un métabolite secondaire (par exemple des acides carboxyliques – produits d'ouverture – voir Figure IV-9).

La régiosélectivité d'oxydation de la débrisoquine par le CYP2U1 est donc partagée par d'autres isoformes humaines (CYP1A1, 3A4,...). En effet, toutes ces isoformes conduisent à la formation majoritaire de 1- et 3-hydroxydébrisoquine ce qui correspond par ailleurs à l'oxydation de la position la plus réactive du point de vue chimique de la débrisoquine (Lightfoot, Ellis et al. 2000).

IV.2.4 Arrimage de la débrisoquine dans le site actif du CYP2U1

IV.2.4.1 Contexte scientifique, arrimage de la débrisoquine au CYP2D6

La débrisoquine étant un des substrats historiques du CYP2D6, son positionnement au sein du site actif du P450 a fait l'objet de nombreuses études. Dès 1996, la construction d'un modèle par homologie du CYP2D6 et des études d'arrimage moléculaire ont permis de caractériser une interaction fondamentale pour le positionnement de la débrisoquine au site actif (de Groot, Vermeulen et al. 1996) : la débrisoquine se lie au site actif par une liaison hydrogène entre sa guanidine (groupe $-NH_2$ donneur de liaison hydrogène) et un acide aspartique de l'hélice I (ASP301, le CO de la fonction acide est accepteur de la liaison hydrogène, voir Figure IV-10).

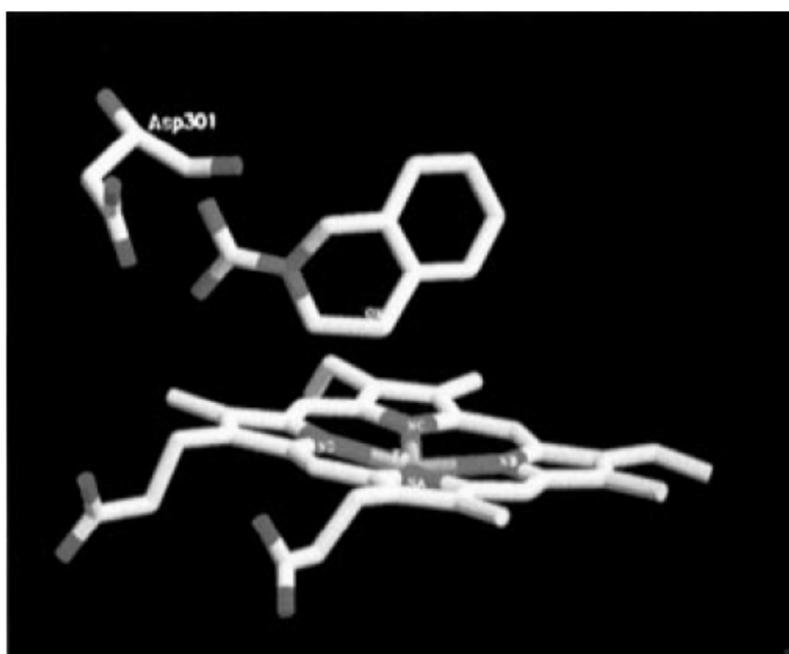


Figure IV-10 : interaction entre la débrisoquine et l'ASP301 au sein du site actif du CYP2D6 (de Groot, Vermeulen et al. 1996)

Avec l'arrivée des premières structures cristallographiques du CYP2D6 (identifiant PDB 2F9Q), un nouvel acide aminé clef pour la liaison au site actif a été identifié par des expériences d'arrimage moléculaire dans les structures cristallisées (Paine, McLaughlin et al. 2003) : le glutamate 216 de l'hélice F serait lui aussi impliqué dans le positionnement de la débrisoquine (via une liaison hydrogène). De plus, des résidus hydrophobes tels que des phénylalanines permettraient de stabiliser le domaine aromatique de la débrisoquine (voir Figure IV-11). Enfin, la stéréosélectivité de l'oxydation de la débrisoquine (formation majoritaire de 4-(S)-hydroxydébrisoquine par le CYP2D6) peut être expliquée par cette pose d'arrimage dans laquelle la débrisoquine est positionnée parallèlement au plan

de l'hème, l'hydroxylation en position 4 se faisant donc majoritairement sur la face de la débrisoquine la plus proche de l'hème.

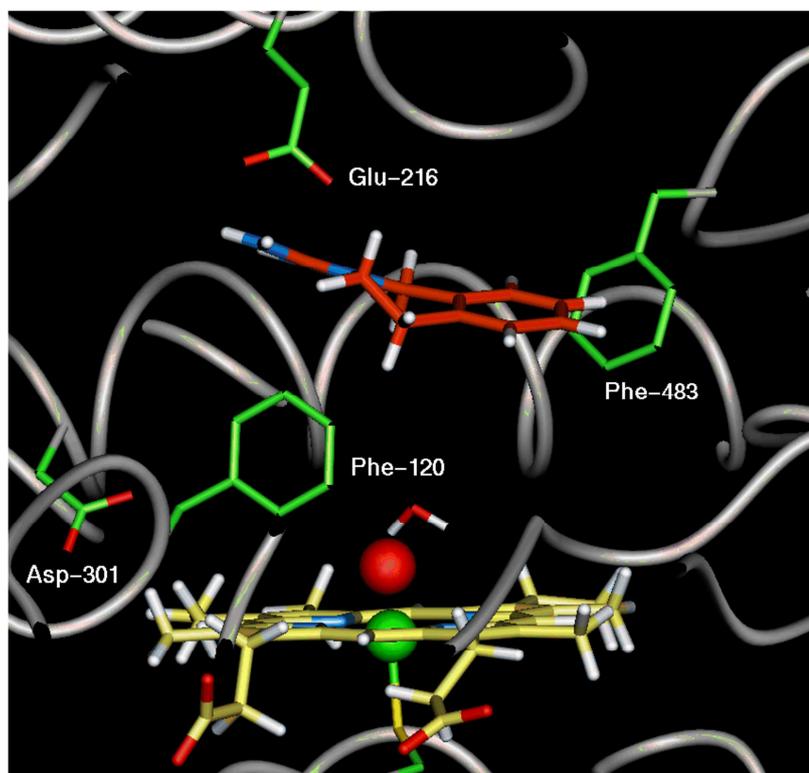


Figure IV-11 : interaction entre la débrisoquine et le site actif du CYP2D6. D'après P. Rowland et al. (Rowland, Blaney et al. 2006). Les atomes de l'hème, de la débrisoquine et des résidus clefs sont représentés en CPK

IV.2.4.2 Des résidus clef conservés ?

Au vu des interactions observées pour l'arrimage de la débrisoquine au sein du site actif du CYP2D6, il est nécessaire de comparer les deux isoformes (2D6 & 2U1) pour examiner la conservation des résidus clefs.

L'alignement des séquences des hélices F et I des CYP2U1 et 2D6 sur lesquelles se trouvent ces résidus est présenté en Figure IV-12. Sur l'hélice F, le glutamate 216 n'est pas conservé dans le CYP2U1. Il existe toutefois un **glutamate (en position 260)** sur l'hélice F du CYP2U1 mais il n'est **pas en interaction avec le site actif**. Sur l'hélice I, l'acide aspartique 301 est quant à lui conservé, son équivalent chez le CYP2U1 est l'acide aspartique 348. Notons qu'il existe pour le CYP2U1 un autre acide aspartique sur l'hélice I (en position 355), lui aussi orienté du côté du site actif. Ce résidu 355 n'a pas d'homologue (ASP ou GLU) chez le CYP2D6.

répertoriés dans le Tableau IV-5. Notons que parmi ces résidus se trouve l'acide aspartique 348 dont l'équivalent chez le CYP2D6 (ASP 301) est un résidu clef pour l'arrimage.

Résidus	Domaine structural
PRO103	hélice A
VAL166	boucle BC
PHE167	
LEU259	hélice F
LEU263	
VAL267	
ASP348	hélice I
ALA352	
ASP355	
THR356	
VAL417	boucle K β 1
PRO418	
LEU419	
ILE421	
PHE528	feuillet β 4
LEU530	
THR531	

Tableau IV-5 : Résidus du CYP2U1 déclarés flexibles pour l'arrimage sous AUTODOCK.

La méthode d'arrimage a été au préalable validée avec l'étude de l'interaction de la débrisoquine avec le CYP2D6 (structure cristallographique d'identifiant PDB 2F9Q). Les résidus déclarés flexibles sont les résidus clef définis précédemment (le glutamate 216, l'aspartate 301 ainsi les résidus tapissant le site actif). Nos expériences d'arrimage de la débrisoquine sur le CYP2D6 cristallisé (code PDB 2F9Q) conduisent à une pose majoritaire très similaire à celle publiée par Rowland et al. (Rowland, Blaney et al. 2006). Les résidus en interaction sont aussi les mêmes que ceux identifiés dans la littérature avec le glutamate 216 formant une liaison de électrostatique avec la guanidine de la débrisoquine et sa partie apolaire stabilisée par des interactions de type π -stacking avec les phénylalanines du site actif. Les poses d'arrimage sont donc compatibles avec la régiosélectivité d'hydroxylation observée. Nous considérons que ce protocole d'arrimage est ainsi fiable.

IV.2.4.4 Analyse des résultats

Les 1000 poses obtenues sont regroupées en *clusters* rassemblant tous les arrimages voisins. Deux poses sont considérées comme proches lorsque le RMSD calculé entre tous les atomes de deux poses du ligand est inférieur à un seuil donné, ici 1.5Å. Ils sont ensuite classés énergétiquement comme sur l'histogramme montré en Figure IV-13.

Dans tous les clusters, la débrisoquine est bien retrouvée dans la cavité du site actif de l'enzyme, en interaction avec divers résidus de celui-ci. Il convient donc d'étudier les clusters les plus favorisés énergétiquement (i.e. ceux d'énergie de liaison les plus faibles).

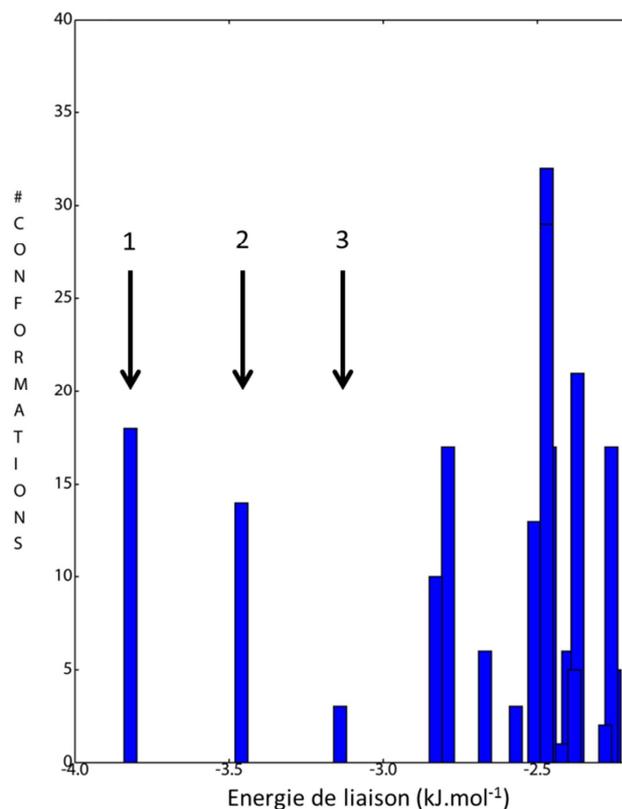


Figure IV-13 : Histogramme des poses de docking de la débrisoquine au sein du site actif du CYP2U1 L'énergie de liaison correspond à un score d'affinité calculé par AUTODOCK. Les clusters 1, 2 et 3 sont indiqués par des flèches.

Les deux premiers *clusters* (ceux d'énergie de liaison les plus faibles) sont composés d'une vingtaine de poses chacun et correspondent à un positionnement similaire, au sein du site actif, de la débrisoquine, compatible avec une hydroxylation sur les carbones aromatiques. Ceux-ci ne diffèrent que par une légère translation de la débrisoquine au sein du site actif.

. Une pose-type issue d'un de ces deux clusters est représentée en Figure IV-14.

Dans cette pose, la débrisoquine est positionnée au-dessus du plan de l'hème, parallèle à celui-ci. Elle est stabilisée par deux interactions faibles : d'une part des interactions hydrophobes entre le groupement phényle de la débrisoquine et les résidus hydrophobes (leucines, valines, phénylalanines) qui l'entourent, majoritaires dans cette portion du site actif. D'autre part, la guanidine interagit via

une liaison hydrogène avec un groupe carbonyle du squelette peptidique dans la boucle K β 1 (liaison avec le carbonyle de la leucine 419).

Dans les clusters 1 et 2, la position de la débrisoquine la plus proche du fer de l'hème, correspondant au métabolisme le plus probable, est la position 6 avec une distance mesurée entre le carbone de la débrisoquine et l'atome de fer de l'hème de 3.9Å.

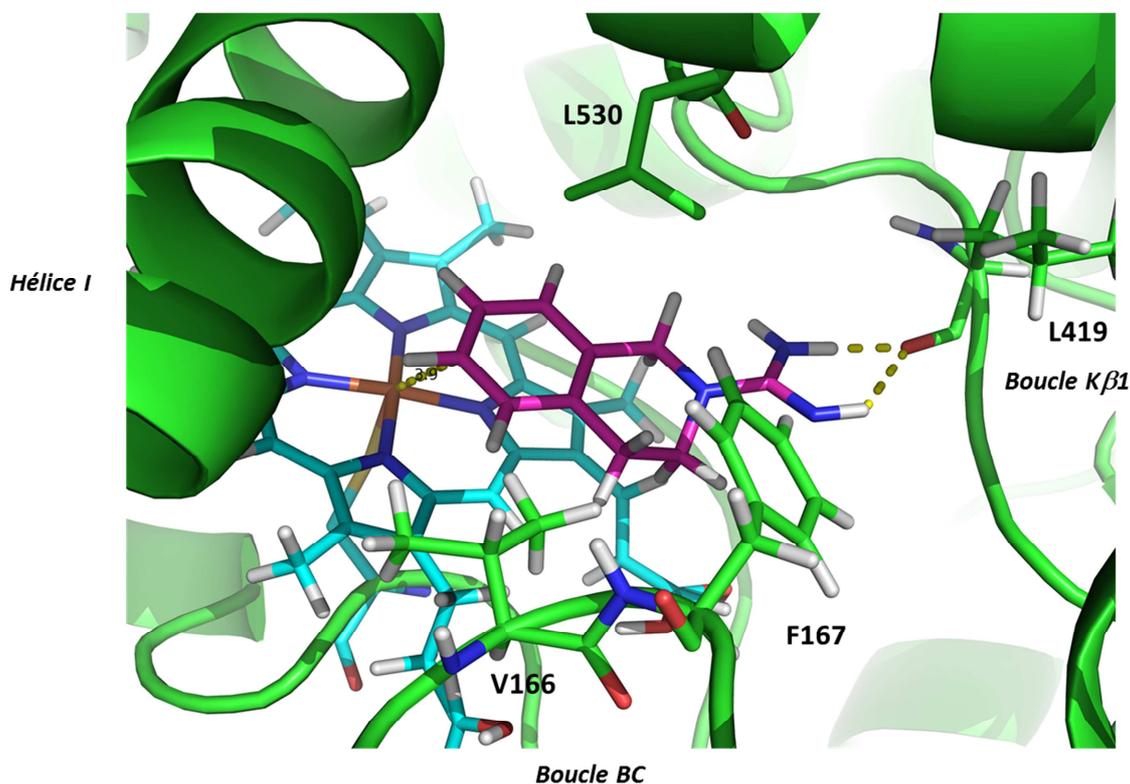


Figure IV-14 : Positionnement majoritaire de la débrisoquine au sein du site actif du CYP2U1 (cluster 1) propice à la formation de la 6-hydroxydébrisoquine. L'apoprotéine est en vert, l'hème en bleu et la débrisoquine en violet.

L'étude du troisième cluster de poses permet d'expliquer l'oxydation des positions aliphatiques

La débrisoquine est, dans ce 3^{ème} cluster, toujours parallèle au plan de l'hème (voir Figure IV-15). La fonction guanidine de la débrisoquine établit deux liaisons hydrogène avec des résidus de l'hélice I : d'une part l'isoleucine 351, via le carbonyle du squelette peptidique, d'autre part, l'acide aspartique 355 via le groupe carboxylate de sa chaîne latérale. De plus, le cycle aromatique de la débrisoquine est stabilisé par des interactions de type hydrophobes avec les nombreux résidus hydrophobes du site actif (notamment la phénylalanine 167).

Position d'hydroxylation sur la débrisoquine	Distance Fer-Carbone (Å)	
	<i>Clusters 1 & 2</i>	<i>Clusters 3</i>
Position 1	> 6	4.2
Position 3	> 6	5.8
Position 4	> 6	5.1
Position 5	4.1	> 6
Position 6	3.9	> 6
Position 7	4.7	> 6
Position 8	5.6	> 6

Tableau IV-6 : Distance entre le fer et les atomes de carbones des positions oxydables de la débrisoquine pour les trois clusters.

Pour ce 3^{ème} cluster de poses, la position la plus proche du Fer est la position 1 de la débrisoquine avec une distance entre les atomes de fer et de carbone de 4.2Å (voir Tableau ci-dessus). La position 4 est elle-aussi en mesure d'être oxydée avec une distance de 5.1Å alors que la position 3 est plus éloignée du site réactionnel (avec une distance au fer proche de 6 Å).

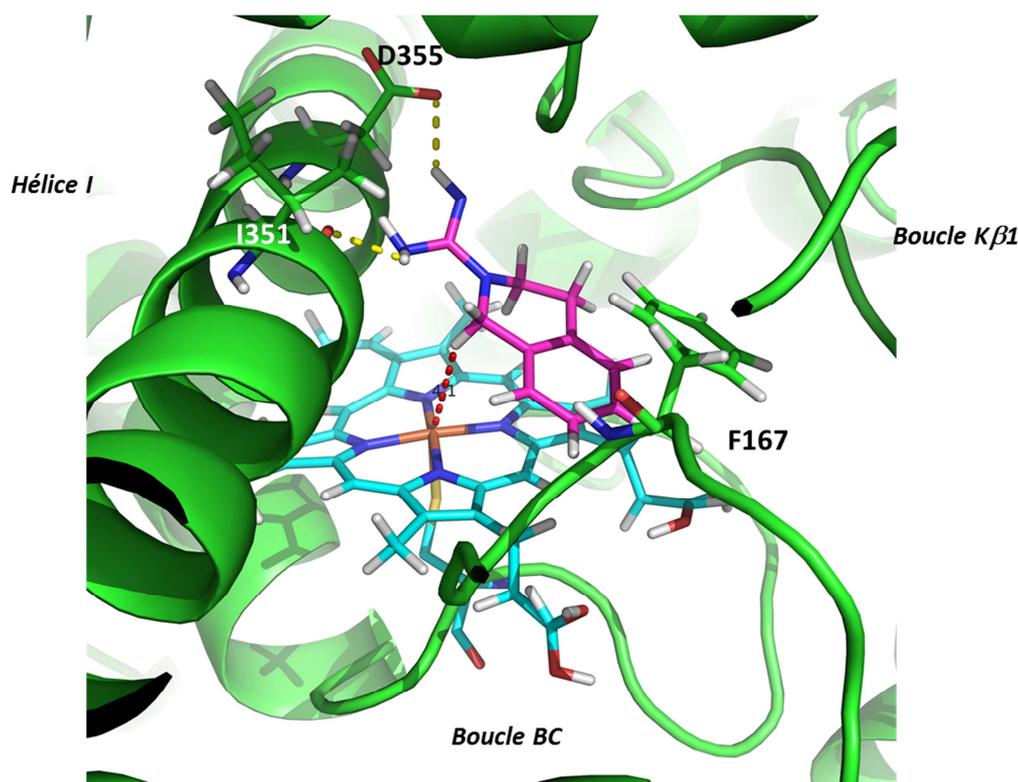


Figure IV-15 Positionnement de la débrisoquine au sein du site actif du CYP2U1 (cluster 3) propice à la formation de la 1-hydroxydébrisoquine. L'apoprotéine est en vert, l'hème en bleu et la débrisoquine en violet.

L'étude de ces trois clusters de poses les plus énergétiquement favorables a donc permis d'expliquer la régiosélectivité d'hydroxylation de la débrisoquine par le CYP2U1.

Les deux premiers clusters de poses sont compatibles avec une hydroxylation aromatique et la position 6 est la plus favorisée. Expérimentalement, cette même position, bien que peu réactive d'un point de vue chimique, est effectivement oxydée par le CYP2U1.

D'autre part le troisième cluster de poses explique quant à lui la régiosélectivité observée sur les positions benzyliques (plus réactives que les positions aromatiques).

Dans ce cluster, la position 1 est la plus favorisée, ce qui correspond bien au métabolisme majoritaire du CYP2U1. La position 4 est elle aussi accessible à l'hydroxylation mais dans une moindre mesure, en bon accord avec ce qui est observé expérimentalement. Enfin, la position 3 est trop éloignée du fer et ne serait pas hydroxylée.

Enfin, au vue des poses d'arrimage observées, il serait intéressant de confirmer les poses par une analyse de l'éventuelle stéréosélectivité des hydroxylation de la débrisoquine par le CYP2U1. En effet, l'hydroxylation par le CYP2D6 en position 4 est stéréosélective avec la formation de

l'énantiomère S de la 4-hydroxydébrisoquine. Cette sélectivité a d'ailleurs été reliée à l'orientation de la molécule au sein du site actif du CYP2D6. Pour le CYP2U1, l'orientation de la débrisoquine au sein du site actif semble privilégier la formation de la 1-(S)-hydroxydébrisoquine car le positionnement de coplanaire de la débrisoquine par rapport à l'hème favorise l'attaque d'un seul des deux protons prochiraux en position 1. Cette analyse des énantiomères de métabolites produits validerait le modèle moléculaire du CYP2UA et l'hypothèse du positionnement déduit de la méthode d'arrimage.

IV.3 Métabolisme des dérivés de la terfénadone par le CYP2U1.

Une seconde activité d'hydroxylation a été détectée sur les dérivés de la terfénadone.

A l'image de l'étude faite sur l'activité d'hydroxylation de la débrisoquine, des incubations de contrôle (en présence d'inhibiteurs de P450 ou en présence de levure transformée par un vecteur vide) ont permis de confirmer la nature P450 dépendante de ces réactions.

IV.3.1 Présentation de la famille de substrats

La terfénadine est un antihistaminique H1 non sédatif, aujourd'hui retiré du marché du médicament (Kinsolving and Munro 1975).

La terfénadone est l'analogue cétonique de la terfénadine (après oxydation de la fonction alcool secondaire de la terfénadine). Les dérivés de la terfénadone que nous avons testés proviennent de substitutions de la fonction tertio-butyle terminale par diverses chaînes aliphatiques. Les structures de cette famille de substrats et d'une molécule analogue, l'ébastine, sont représentées en Figure IV-16.

Aussi bien la terfénadine, la terfénadone qu'une grande partie des dérivés de terfénadone sont substrats du CYP2J2, un des isoforme les plus proches du CYP2U1 chez l'homme (Lafite, Dijols et al. 2006). Les produits du métabolisme de cette série de molécules par le CYP2J2 sont des produits d'hydroxylation sur la chaîne aliphatique terminale (flèches bleues sur la Figure IV-16). Ces substances sont aussi métabolisées par un autre P450 humain, le CYP3A4, qui forme majoritairement des produits de N-déalkylation mais aussi dans une moindre mesure, des produits d'hydroxylation similaires à ceux formés par le CYP2J2 (Yun, Okerholm et al. 1993).

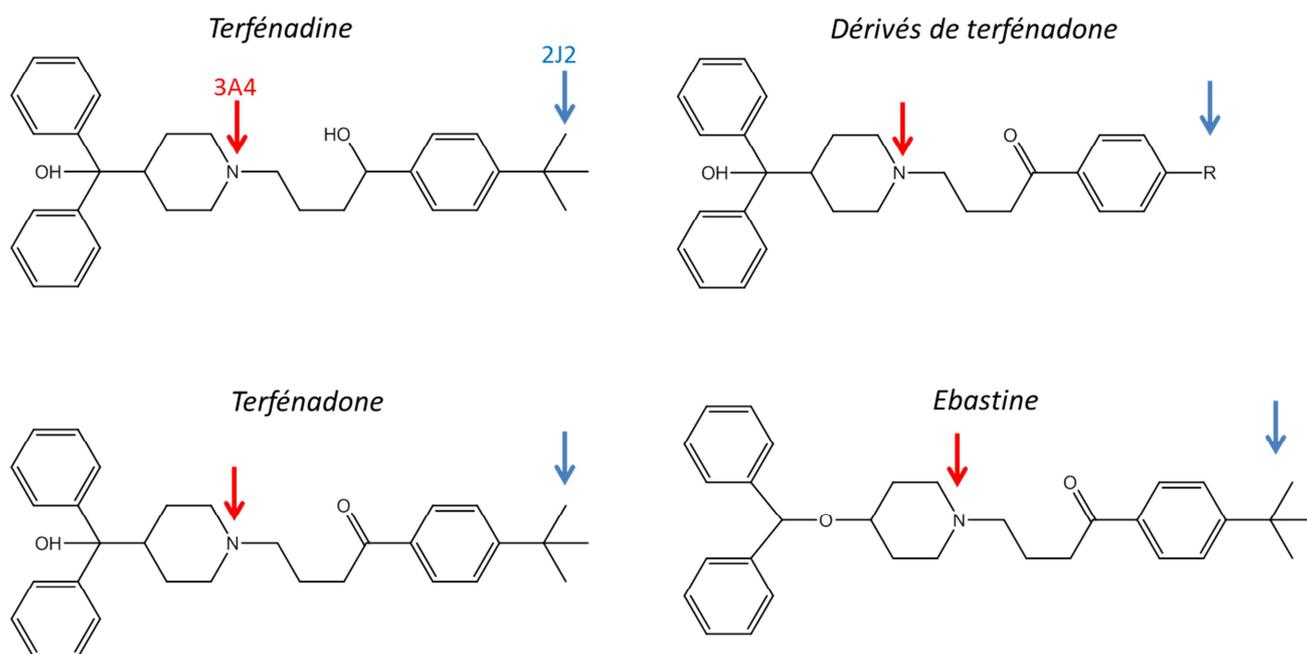


Figure IV-16 : Structure de la terfénadine, de l'ébastine, de la terfénadone et de ses analogues. Les positions d'hydroxylation pour le CYP2J2 sont marquées par une flèche bleue, le site préférentiel d'attaque du CYP3A4 par une flèche rouge.

IV.3.2 Régiosélectivité d'hydroxylation des analogues de terfénadone par le CYP2U1

La régiosélectivité d'hydroxylation des analogues par le CYP2U1 a été étudiée et comparée à celle observée pour le CYP2J2. L'identification des produits de métabolisme est faite par analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse. Les produits sont ainsi caractérisés par leurs temps de rétention et par leurs fragments caractéristiques en MS². L'attribution est confirmée par comparaison avec les produits d'hydroxylation des CYP2J2 et 3A4 dont on connaît la régiosélectivité d'hydroxylation.

❖ Identification des produits de métabolisme : exemple de l'éthylterfénadone

Deux pics correspondant à des produits d'hydroxylation (m/z 458), notés **M'1** et **M'2** ont été détectés à des temps de rétention de 12.2 et 13.0 min (Figure IV-17). Les fragments issus de la fragmentation SM² ont été attribués, ce qui a permis l'identification de ces produits. L'alcool **M'2** présente un fragment spécifique à un rapport m/z de 175. Ce fragment correspond à la cassure au niveau du cycle azoté d'une part et de la perte d'un méthyle d'autre part (les spectres et les attributions sont détaillés en Figure IV-18). Un fragment méthyl ne peut exister qu'avec l'alcool benzylique. **Le métabolite M'2 est donc l'alcool benzylique.** Le spectre de fragmentation de M'1 ne présente pas le

fragment caractéristique à un rapport m/z de 176. Le métabolite M'1 porte donc l'alcool en position terminale.

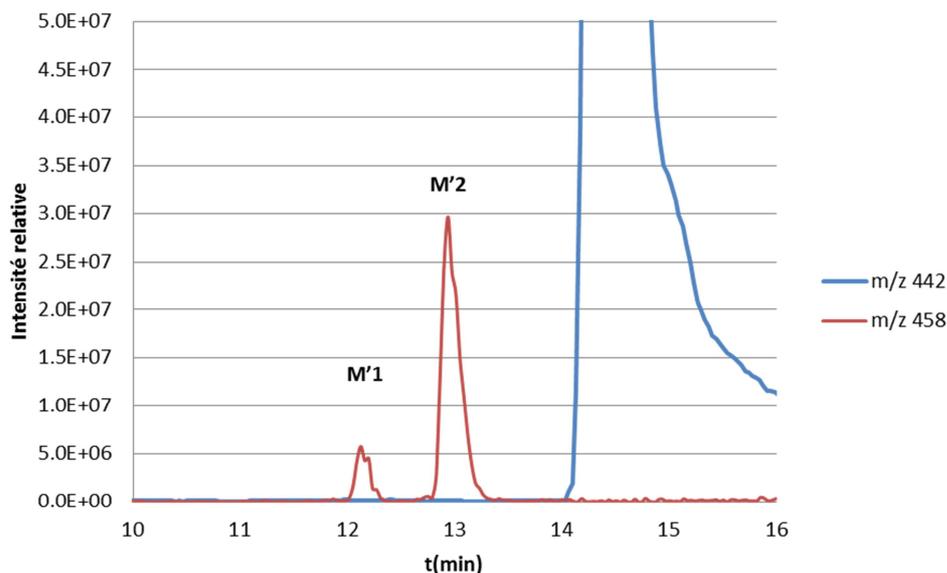


Figure IV-17 : Chromatogramme CLHP/SM obtenu après incubation d'ethylterféfadone avec le CYP2U1. Les ions détectés au rapport m/z 442 correspondent à l'ethylterféfadone, ceux à m/z 458 aux produits d'hydroxylation.

Le métabolite majoritairement formé par le CYP2U1 à partir de l'ethylterféfadone est donc l'alcool benzylique (ou α). Cette régiosélectivité correspond à l'attaque par le CYP2U1 de la position la plus favorisée du point de vue chimique (la position benzylique est plus électrophile qu'une position aliphatique). Une quantification précise de ces deux produits d'hydroxylation a été effectuée par analyse de ces mêmes produits d'hydroxylation par un système de chromatographie liquide couplé à un détecteur UV-visible (détection à 254 nm) : la proportion en produit d'oxydation benzylique est de 72 ± 5 % pour 28 ± 5 % de produit d'hydroxylation en position terminale.

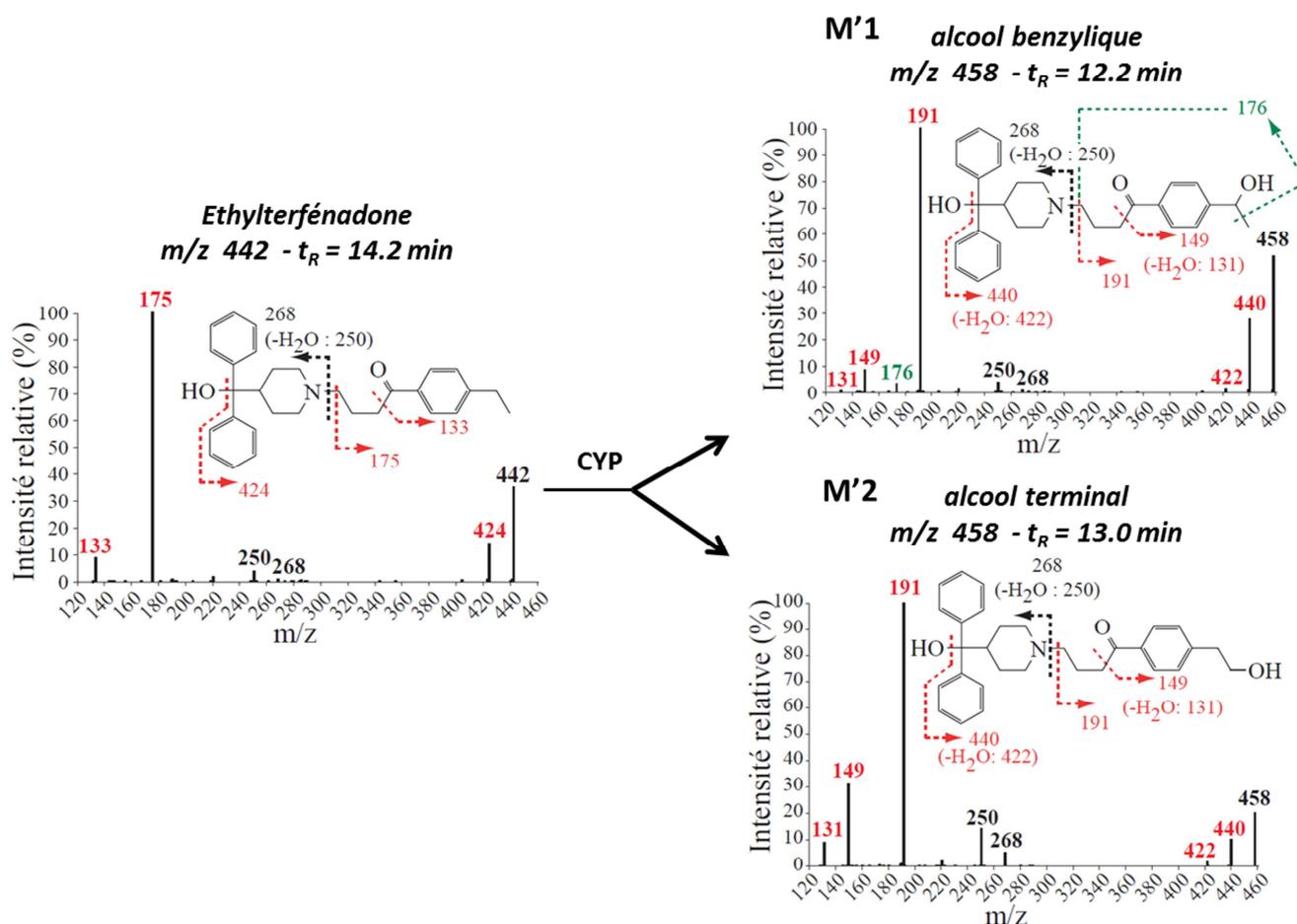
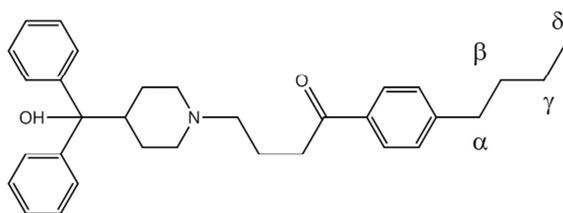


Figure IV-18 : Spectres de fragmentation SM² et assignation structurale des fragments pour les deux métabolites formés après oxydation de l'éthylterfenadone par le CYP2U1. Ionisation ESI⁺. Les fragments indiqués en noir représentent les fragments dont la masse ne change pas après oxydation, ceux en rouges, les fragments qui voient leur masse augmentée de 16 après oxydation. Le fragment caractéristique de l'alcool benzylique est indiqué en vert.

❖ Bilan de la régiosélectivité d'hydroxylation

L'identification et la quantification des produits d'hydroxylation des autres substrats de cette famille ont été effectuées selon la même méthode que pour l'éthylterfenadone (identification des produits grâce aux produits de fragmentation en SM² et quantification par détection UV-visible). Les régiosélectivités d'oxydation de cette série de molécules sont proposées dans le Tableau IV-7.



Chaîne terminale	Position d'hydroxylation (%)			
	α	β	γ	δ
Méthyle	100			
Ethyle	72 \pm 5	28 \pm 5		
Propyle	68 \pm 5	22 \pm 5	10 \pm 2	
Butyle	66 \pm 5	27 \pm 5	7 \pm 2	n.d.

Tableau IV-7 : Régiosélectivité d'hydroxylation des dérivés de terfénadone par le CYP2U1.

Quel que soit le substrat choisi, la position benzylique est celle qui est majoritairement oxydée (le produit ainsi formé correspond à plus de 65% du total des produits d'oxydation). Les autres positions sont beaucoup moins affectées par l'oxydation et plus on s'éloigne du groupement phényle, plus la proportion d'alcool formé est faible (7 à 10% d'alcool formé en γ , le produit d'hydroxylation en δ n'étant quant à lui pas détecté).

Cette régiosélectivité est en tout point similaire à la réactivité inhérente à chaque position. En effet, le carbone en position benzylique est plus facilement oxydable que ceux des positions aliphatiques, ce qui est observé expérimentalement. La régiosélectivité d'hydroxylation semble donc être en partie liée à réactivité inhérente de chaque position. Cependant, ce paramètre ne permet pas d'expliquer totalement la régiosélectivité observée et notamment pourquoi il existe de telles différences de ratios d'hydroxylation en position aliphatique (ces proportions allant de 0% pour l'hydroxylation en δ de la butylterfénadone à 28% pour l'hydroxylation en β de l'éthylterfénadone).

Nous chercherons donc à expliquer ces résultats par une méthode de bio-informatique : l'étude des positions d'arrimage de ces molécules au sein du site actif du CYP2U1.

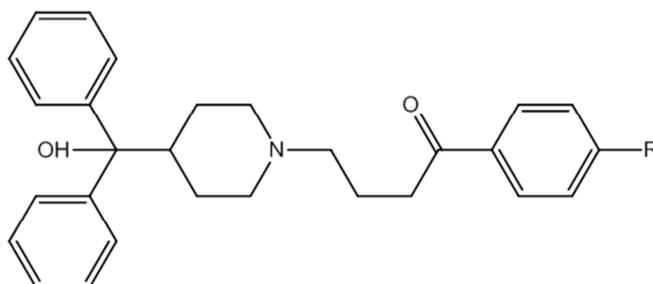
IV.3.3 Cinétique d'hydroxylation des analogues de terfénadone par le CYP2U1

Sur la série de dérivés de terfénadone disponibles et testés, alors que tous sont substrats et/ou inhibiteurs des CYP2J2 et 3A4, le CYP2U1 catalyse l'oxydation de seulement quelques molécules. En effet, un groupement terminal volumineux (tel qu'un tertio-butyle) semble être incompatible avec une activité CYP2U1 hydroxylase. De même la présence d'un groupement alcool ou acétate en bout de chaîne rend la molécule inactive vis-à-vis du CYP2U1 (voir Tableau IV-8).

Pour chaque substrat, une recherche des constantes cinétiques a été effectuée. Dans le cas d'activités d'hydroxylation multiples (plusieurs positions d'hydroxylation observées) seule la

formation du produit de métabolisme principal a été quantifiée (les constantes de Mickaelis-Menten et les vitesses maximales sont alors reportées dans le Tableau IV-8). Quel que soit le substrat, l'affinité avec le CYP2U1 reste modeste, de l'ordre de 1 mM (pour rappel, l'affinité observée pour la débrisoquine est deux fois plus forte, de l'ordre de 400-500 μM).

A titre de comparaison, l'affinité de ces mêmes composés pour le CYP2J2 est de l'ordre de 0.5 μM (pour des V_m de l'ordre de 30 min^{-1}).



Composé	Activité hydroxylase	K_M (mM)	V_M (min^{-1})	
Terfénadone	-	-	-	
Ebastine	-	-	-	
R =	-CH ₃	+	1.6	0.9
	-CH ₂ -CH ₃	+	1.2	0.4
	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	+	0.8	0.6
	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	+	1.1	0.4
	-(CH ₂) ₃ -OH	-	-	-
	-(CH ₂) ₃ -OAc	-	-	-

Tableau IV-8 : Hydroxylation des analogues de terfénadone par le CYP2U1 et activités enzymatiques associées. Des incubations de 15 min ont été effectuées dans un volume total de 200 μL , en présence de 25 pmol d'enzyme à une température de 28°C

IV.3.4 Arrimage de l'éthylterfénadone dans le site actif de l'enzyme

IV.3.4.1 Rappels : arrimage de l'éthylterfénadone au site actif du CYP2J2

L'arrimage de dérivés de terfénadone au site actif du CYP2J2 a déjà été étudié, d'une part avec une méthode de dynamique sous contraintes (Lafite, Andre et al. 2007), d'autre part via une méthode classique d'arrimage semi-flexible (Li, Tang et al. 2008). Quel que soit la méthode d'arrimage utilisée et quel que soit le dérivé de terfénadone, les poses d'arrimages prédites sont toutes similaires avec le substrat inséré dans l'un des canaux d'accès au site actif (le canal 2b). De plus, un résidu de la boucle BC, l'arginine 117, joue un rôle prépondérant dans cette association. Il crée en effet une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle et/ou l'azote de la terfénadone (ou de ses dérivés –voir Figure IV-19). Les autres interactions relevées dans ces complexes enzymes-substrat sont pour l'essentiel des interactions hydrophobes ; on peut néanmoins remarquer le rôle spécifique de la phénylalanine 310 qui interagit en π -stacking avec le groupement phényle terminal de l'éthylterfénadone.

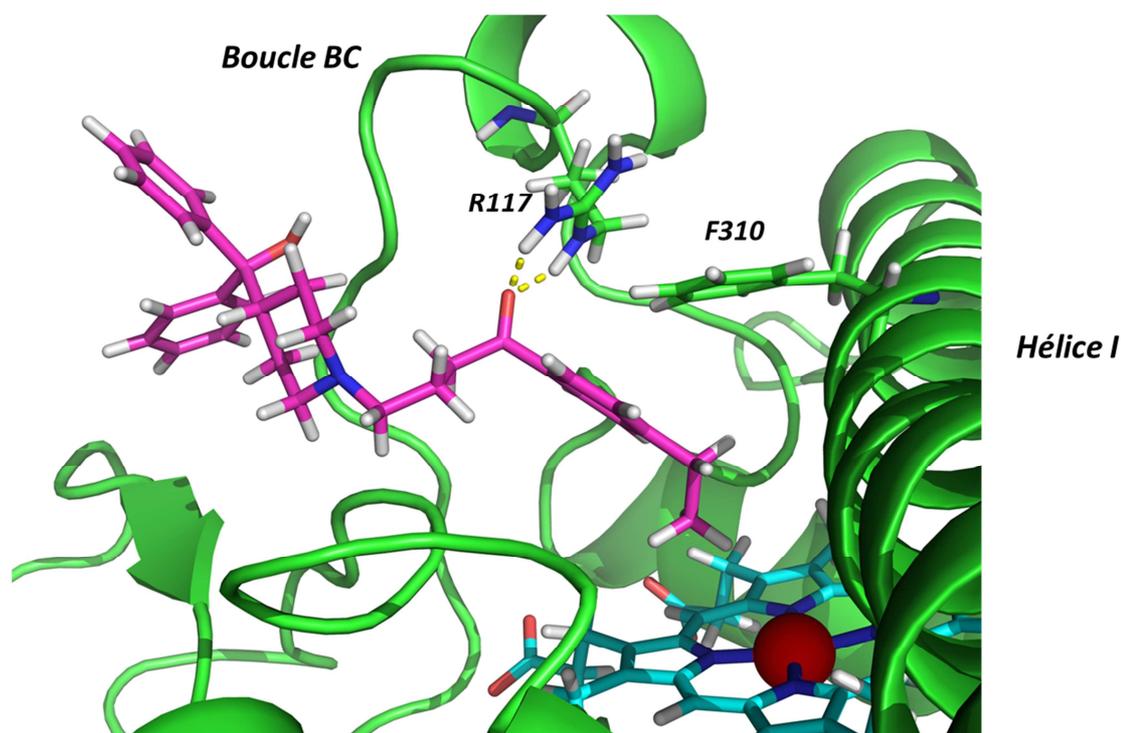


Figure IV-19 : Positionnement de l'éthylterfénadone au sein du site actif du CYP2J2. L'apoprotéine est en vert, l'hème en bleu et l'éthylterfénadone en violet.

IV.3.4.2 Conservation des résidus clef

Pour le CYP2U1, il n'existe pas d'équivalent polaire de l'arginine 117 du CYP2J2. En effet, dans l'alignement des séquences de ces deux isoformes (Figure IV-20), l'arginine 117 du CYP2J2 a pour équivalent un résidu apolaire, l'isoleucine 156. Dans ces conditions, on peut prédire que le mode d'association des dérivés de terfénadone diffère entre les CYP2J2 et 2U1 et donc que les substrats ne s'arriment pas dans le canal 2b du site actif du CYP2U1, faute d'un résidu polaire et/ou protique capable d'arrimer le substrat dans cette région de la protéine.

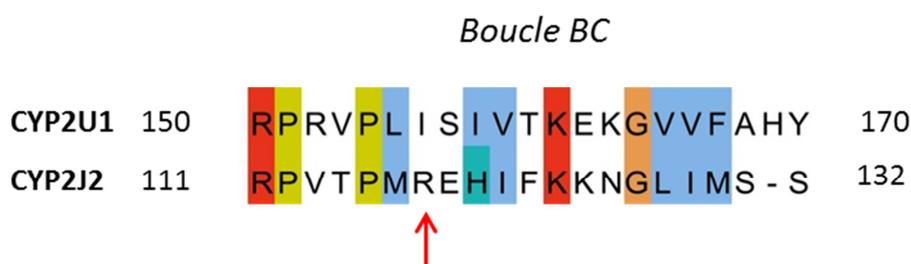


Figure IV-20 : Alignement des séquences protéiques de la boucle BC des CYP2U1 et 2J2

IV.3.4.3 Processus d'arrimage AUTODOCK

Nous avons appliqué la même méthode d'arrimage que celle utilisée pour la débrisoquine (voir partie IV.2.4.3). Les résidus déclarés flexibles sont ceux qui forment les canaux d'accès majeurs identifiés par l'analyse présentée en partie II.5.1.2 et ceux qui tapissent le site actif. Nous avons choisi de détailler plus particulièrement l'arrimage d'un substrat pour lequel la régiosélectivité pouvait être discutée, à savoir l'éthylterfénadone. L'arrimage des autres analogues de cette famille présente des clusters de poses similaires avec des interactions impliquant les mêmes résidus de la protéine

IV.3.4.4 Résultats d'arrimage

Les clusters d'arrimage de l'éthylterfénadone au sein du site actif du CYP2U1 sont représentés sous forme d'histogrammes en Figure IV-21. Le regroupement en cluster de poses est obtenu pour un seuil de similarité de 3Å entre deux poses (le seuil est plus élevé qu'avec la débrisoquine du fait du grand nombre de degrés de liberté des dérivés de terfénadone). Deux clusters de faible énergie (-3 et -2.5 kcal.mol⁻¹) et comprenant un grand nombre de poses (plus de 100) sont compatibles avec les activités observées. Ils sont marqués d'une flèche sur la Figure IV-21. Les autres clusters correspondent à des arrimages pour lesquels le substrat est éloigné du site actif.

L'existence de ces poses non productives n'est pas surprenant, car la d'arrimage dans laquelle se fait la recherche de pose est très élargie de façon à incorporer les canaux d'accès. Ces poses de bonne affinité mais hors du site actif correspondent à des positionnements intermédiaires du substrat au cours de son cheminement.

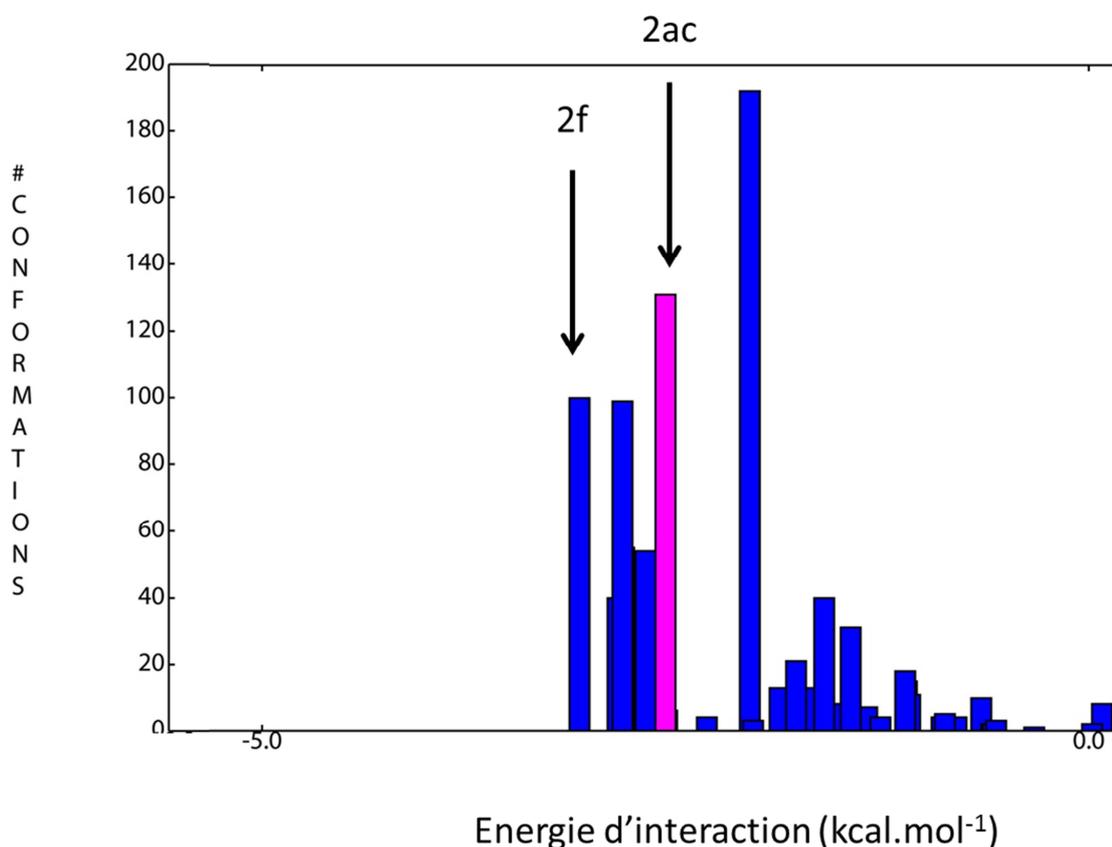


Figure IV-21 : Histogramme des clusters de poses d'arrimage de l'éthylterféfadone en fonction de l'énergie d'interaction.

❖ De nouvelles voies d'accès au site actif par rapport au CYP2J2

Le positionnement de l'éthylterféfadone au sein du site actif du CYP2U1, donné par les deux clusters majeurs de la Figure IV-21, diffère de ce qui a été observé avec le CYP2J2, en particulier par les canaux d'accès empruntés par le substrat. En effet, alors que l'éthylterféfadone entre au site actif du CYP2J2 via le canal 2b, l'arrimage au CYP2U1 privilégie deux autres canaux, les canaux 2f et 2ac, correspondant aux deux clusters de poses mentionnés ci-dessus. Le positionnement de l'éthylterféfadone dans ces deux canaux d'accès est donné en Figure IV-22. Il semble donc que l'absence de résidu capable de créer une liaison hydrogène avec le groupement cétone du substrat dans

le canal 2b du CYP2U1 (équivalent à l'arginine 117 du CYP2J2) oriente le substrat vers d'autres voies d'entrée.

Les canaux d'accès 2ac et 2f dans lesquels est insérée l'éthylterfénadone dans le CYP2U1 ont cependant la particularité d'être très proches structurellement. Ainsi, la partie la plus profonde de ces deux canaux (au plus près du site actif) est commune et c'est seulement vers l'extérieur de la structure que les canaux divergent : ils débouchent de part et d'autre de l'hélice F.

Au voisinage du site actif du CYP2U1, et ce pour les deux clusters de poses, l'éthylterfénadone interagit donc avec les mêmes résidus quel que soit le canal d'accès (2f ou 2ac). Les interactions diffèrent seulement du côté périphérique de la protéine.

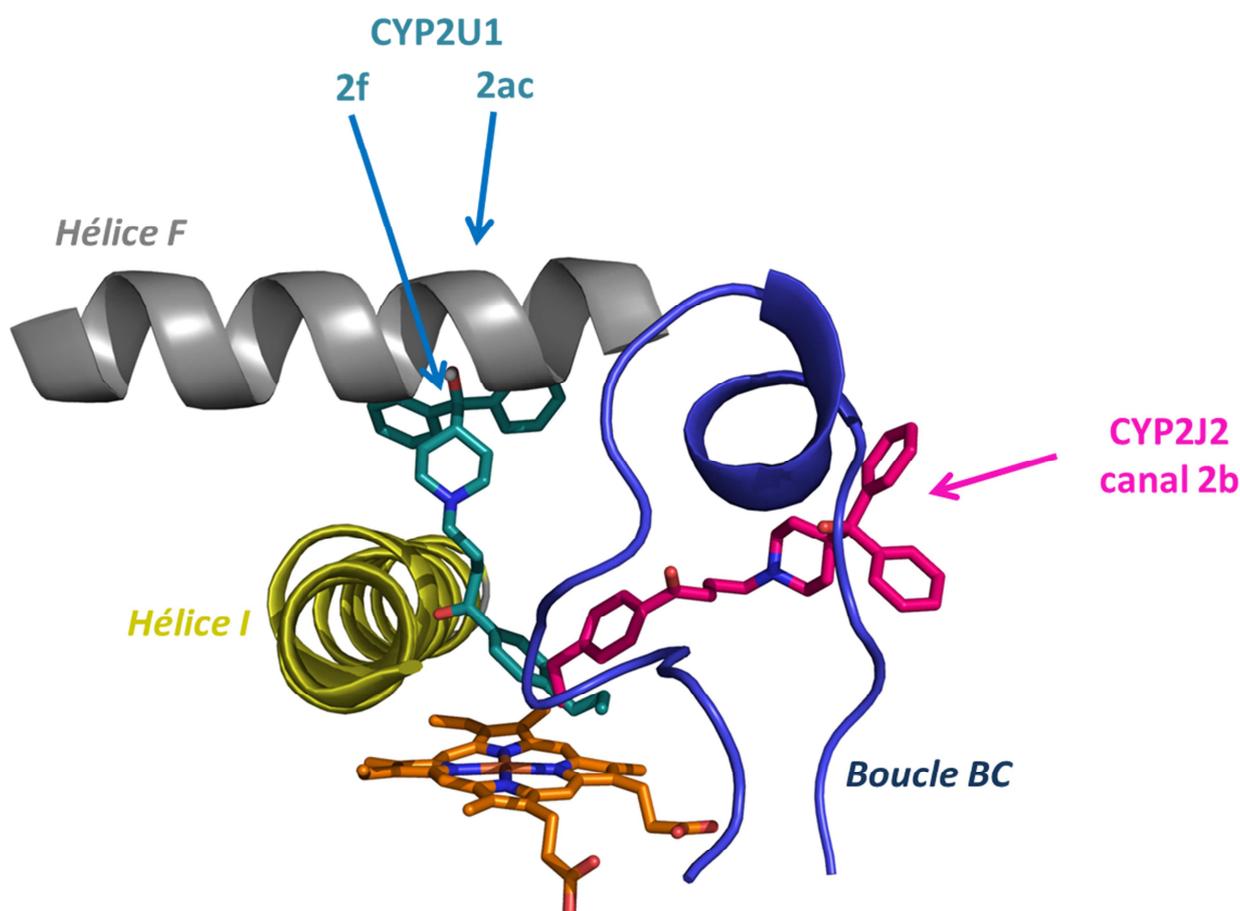


Figure IV-22 : Orientations comparées de l'éthylterfénadone au sein des sites actifs des CYP2J2 et 2U1. Quelques éléments de structures secondaires de site actif sont représentés en mode cartoon (hélice I, hélice F et boucle BC), l'éthylterfénadone issue d'un arrimage avec le CYP2J2 est représentée en magenta celle issue d'un arrimage avec le CYP2U1 en bleu. Pour l'accès au site actif du CYP2U1, seule la molécule entrée par le canal 2f est représentée par souci de clarté.

❖ Description des interactions de l'éthylterféadone avec le CYP2U1.

Une vue des poses d'arrimage et un schéma des interactions correspondantes sont présentés sur la Figure IV-23 pour l'entrée par le canal 2f et sur la Figure IV-24 pour l'entrée par le canal 2ac.

Lorsque le substrat est arrimé au canal 2f, la partie aliphatique terminale de l'éthylterféadone (à proximité du site actif) est en interaction avec des résidus hydrophobes (valine, leucine, ...). En outre, on observe une interaction de type π -stacking avec une phénylalanine de la boucle BC (F167). La cétone de l'éthylterféadone forme quant à elle une liaison hydrogène avec l'hydroxyle d'une thréonine de l'hélice I (T356) alors que la fonction amine est en interaction avec l'acide aspartique (D355) de cette même hélice. Le reste des contacts de la protéine avec le substrat est assuré principalement par des interactions de type hydrophobe (en vert sur le schéma). L'arrimage est finalement davantage assuré par le canal que par les résidus hydrophobes proches de l'hème. Cela donne des pistes pour le design ou la prédiction d'autres substrats.

Entrée du substrat par le canal 2f

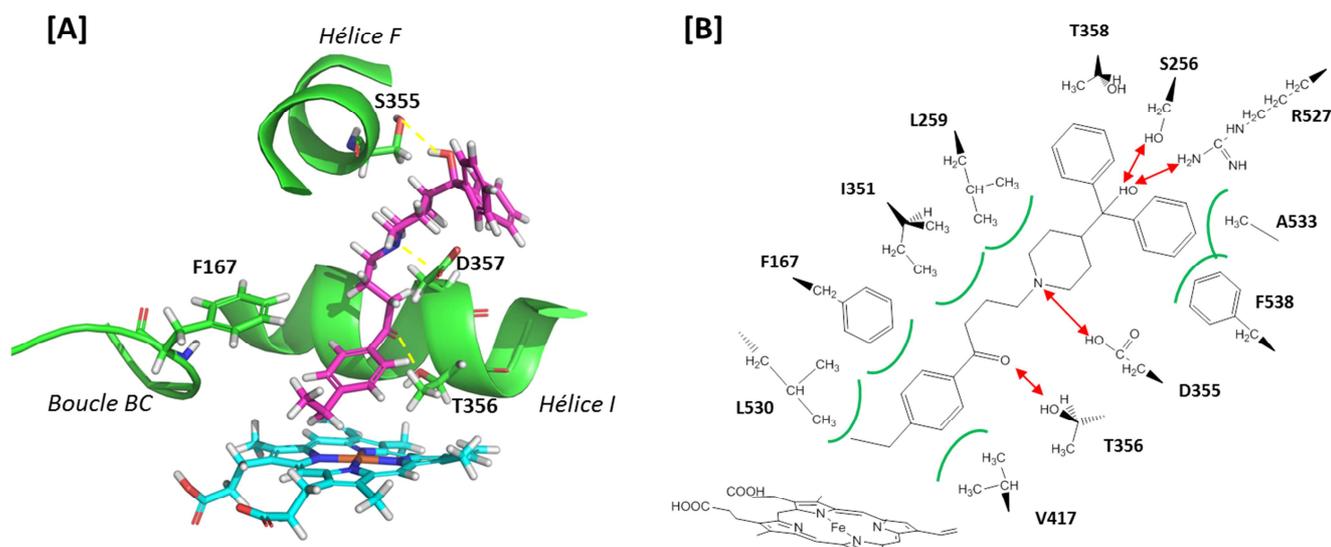


Figure IV-23 : [A] : Positionnement de l'éthylterféadone au sein du site actif du CYP2U1 pour une entrée par le canal 2f. L'apoprotéine est en vert, l'hème en bleu et l'éthylterféadone en violet. [B] : Interactions relevées dans les complexes. Les liaisons hydrogènes et électrostatiques sont représentées par des flèches rouges, les interactions de Van der Waals sont indiquées en vert.

Lorsque le substrat est arrimé au canal 2ac (Figure IV-24) le même jeu d'interactions hydrophobes est retrouvé avec la partie terminale de l'éthylterféadone (à proximité de l'hème) et l'on

observe aussi l'interaction de type π -stacking avec la phénylalanine 167 de la boucle BC. L'arrimage de cette partie du substrat est donc commun aux deux clusters de poses.

Par contre, la liaison avec la cétone est assurée par une lysine de la boucle BC (K161). De plus, une interaction entre un acide aspartique de l'hélice I (D348) et la fonction amine de l'éthylterféfadone est observée. Enfin, d'une façon similaire au canal 2f, le reste des interactions protéine-substrat se compose pour l'essentiel d'interactions hydrophobes via des résidus apolaires nombreux du côté de la sortie de la protéine (isoleucine, leucine, alanine).

Entrée du substrat par le canal 2ac

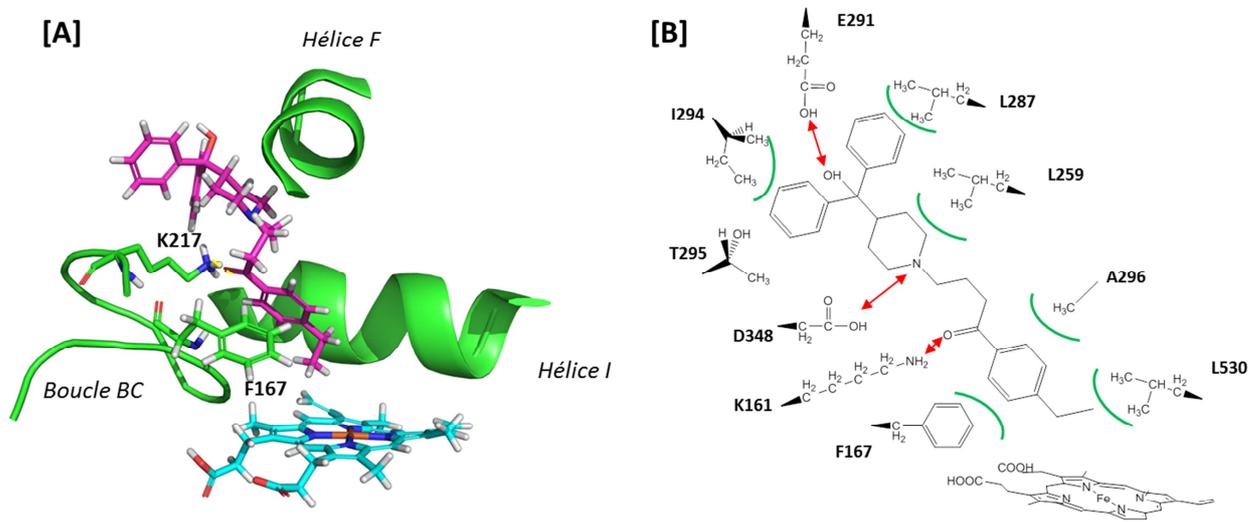


Figure IV-24 : [A] : Positionnement de l'éthylterféfadone au sein du site actif du CYP2U1 pour une entrée du substrat par le canal 2ac. L'apoprotéine est en vert, l'hème en bleu et l'éthylterféfadone en violet, **[B] : Interactions relevées dans les complexes.** Les liaisons hydrogènes et électrostatiques sont représentées par des flèches rouges, les interactions de Van der Waals sont indiquées en vert.

Les deux positionnements de l'éthylterféfadone au sein du site actif du CYP2U1 mettent en évidence un jeu d'interactions stabilisant fortement le complexe enzyme-substrat. La partie phényl-ethyle conserve le même jeu d'interactions dans les deux clusters de poses du fait de l'existence d'un domaine commun aux deux canaux d'accès à cet endroit. On observe par ailleurs le même type de liaisons avec les fonctions cétone et amine de l'éthylterféfadone mais les résidus impliqués dépendent du canal d'accès emprunté par le substrat.

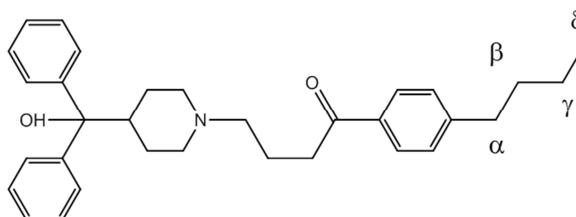
❖ Arrimage des autres analogues de terféfadone

Nous avons répété les expériences d'arrimage sur le CYP2U1 avec 3 autres analogues (méthyl-, propyl- et butylterféfadone). L'analyse de résultats montre que ces molécules présentent exactement les mêmes caractéristiques de fixation que celles décrites pour l'arrimage de l'éthylterféfadone (même canaux d'accès et mêmes résidus en interaction). Seuls les résidus au voisinage immédiat de l'hème (première couronne hydrophobe) diffèrent dans le jeu d'interaction avec la chaîne aliphatique terminale.

❖ Régiosélectivité expliquée par les poses d'arrimage

L'arrimage d'analogues de terféfadone au sein du site actif du CYP2U1 montre qu'il existe une contrainte de distance entre les différentes positions de bout de chaîne et le fer de l'hème. En effet, toutes les poses d'arrimage font état d'une ou plusieurs liaisons hydrogènes entre la cétone et l'amine de ces analogues d'une part et des résidus des canaux d'accès d'autre part. De plus, la position au voisinage du site actif des dérivés de terféfadone est aussi influencée par l'interaction commune aux deux canaux, de type π -stacking entre le groupement phényle et la phénylalanine 167. L'enfouissement du substrat dans les canaux est ainsi contrôlé par ce jeu d'interactions faibles.

Les distances entre l'atome de fer de l'hème et chacun des quatre carbones de la partie alkyle terminale du substrat ont été mesurées dans les poses de meilleure affinité pour chaque dérivé. Ces mesures sont résumées dans le Tableau IV-9 et confrontées aux résultats de métabolisme donnés dans le Tableau IV-8. Ces distances correspondent à une moyenne calculée sur 20 poses Autodock issues des clusters 2f et 2ac.



Chaîne terminale	Distance avec le Fer (Å) ^a				Position d'hydroxylation (%) ^b			
	C α	C β	C γ	C δ	α	β	γ	δ
Methyle	3.6 ± 0.2				100			
Ethyle	3.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2			72 ± 5	28 ± 5		
Propyle	4.0 ± 0.2	5.3 ± 0.2	6.2 ± 0.4		68 ± 5	22 ± 5	10 ± 2	
Butyle	3.5 ± 0.2	4.7 ± 0.2	5.9 ± 0.4	6.7 ± 0.4	66 ± 5	27 ± 5	7 ± 2	<1%

Tableau IV-9 : Distances (Å) entre les carbones aliphatiques des analogues de terfénadone et le fer de l'hème et comparaison avec la régiosélectivité d'hydroxylation par le CYP2U1. (a) : les valeurs de distances correspondent à la moyenne de 10 distances issues de chacun des deux clusters. (b) : régiosélectivité du métabolisme observé expérimentalement.

Dans les structures de complexes P450-substrat publiées dans la littérature, les distances observées entre le fer de l'hème et le carbone hydroxylé varient généralement de 4 à 5 Å et il existe une corrélation entre la distance Fe^{III}-C calculée sur les structures cristallographiques de complexes P450/substrat et la régiosélectivité d'oxydation observée (Poulos and Johnson 2005).

Les valeurs de distances Fe^{III}-C calculées pour les arrimages au sein du site actif du CYP2U1 (Tableau IV-9 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) sont bien dans cette fourchette de distances puisqu'elles varient entre 3.5 ± 0.2 et 6.2 ± 0.4 Å pour des arrimages correspondant à des métabolismes observés expérimentalement. Seule la distance calculée pour l'arrimage de la butylterfénadone excède largement la distance limite de 6 Å ce qui concorde avec l'absence de réactivité en cette position. Cela est en très bon accord avec l'arrimage des analogues de terfénadone dans les canaux d'accès, ce qui ne modifie pas le positionnement global du substrat face à l'hème. Les positions α et β sont toujours hydroxylées.

Bien que les valeurs absolues de ces distances doivent être considérées avec précaution du fait qu'il ne s'agit pas de données cristallographiques mais seulement d'un calcul d'arrimage à partir d'un modèle de protéine, il est néanmoins frappant de constater la corrélation obtenue entre la régiosélectivité d'oxydation observée expérimentalement et les calculs de distances Fe^{III}-C. Ainsi, l'hydroxylation majoritaire en position benzylique de tous les analogues actifs de la terfénadone est en

parfait accord avec des distances Fe-C^α mesurées (comprises entre 3.5 ± 0.2 et 4.0 ± 0.2 Å). De même, l'ordre des distances mesurées (Fe-C^α < Fe-C^β < Fe-C^γ < Fe-C^δ) concorde avec la régiosélectivité observée : l'oxydation du carbone en position benzylique est favorisée par rapport à celle en position homo-benzylique, cette dernière étant elle-même favorisée par rapport au carbone γ.

❖ Influence des résidus de la première couronne

Nos expériences d'arrimage d'analogues de la terfénadone au site actif du CYP2U1 permettent donc de bien rendre compte de la régiosélectivité d'hydroxylation observée expérimentalement. Cependant, la régiosélectivité du CYP2U1 pour ces substrats n'est pas aussi forte qu'avec le CYP2J2 dont le produit d'hydroxylation majoritaire en position homobenzylique pour l'éthylterfénadone par exemple, est formé à 98%. Cette différence peut s'expliquer par l'influence des résidus de la première couronne qui, comme nous l'avons vu en partie II.4.2 p. 86, laissent peu de place pour l'accès au substrat dans le CYP2J2 alors que cette couronne présente moins de contraintes pour le CYP2U1 comme illustré sur la Figure IV-25. **Ainsi la flexibilité de la chaîne terminale au voisinage de l'hème est plus importante pour le CYP2U1 que pour le CYP2J2** ce qui explique la moindre régiosélectivité observée avec le CYP2U1.

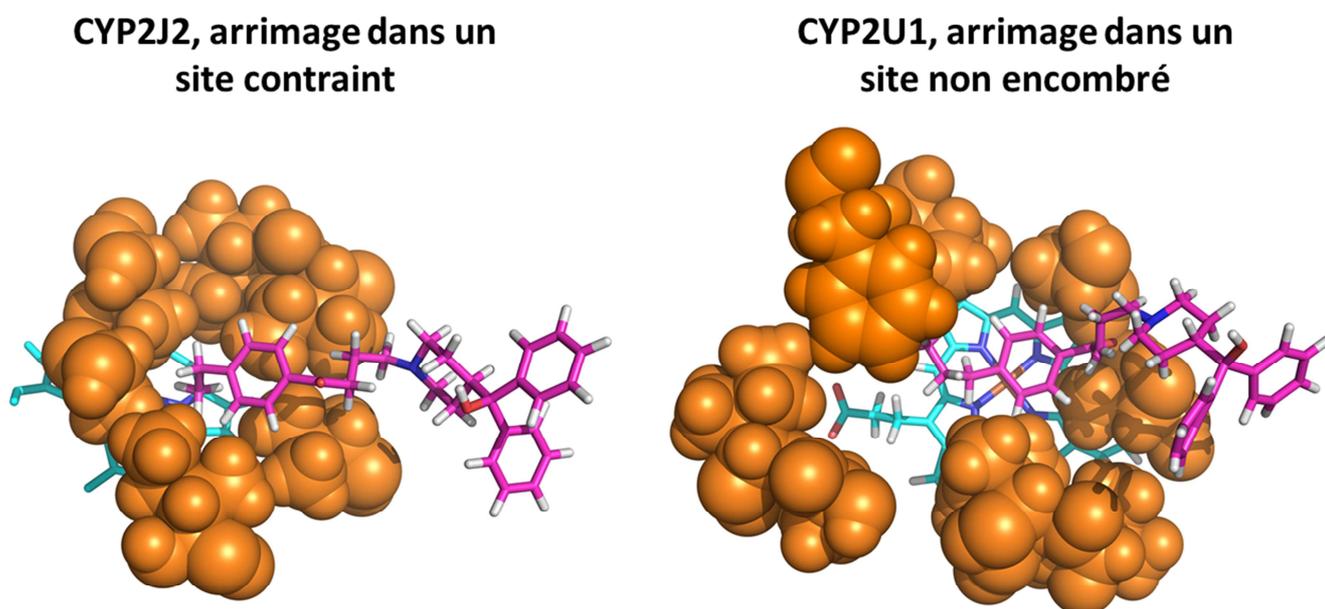


Figure IV-25 : Les résidus de la première couronne lors de l'arrimage de l'éthylterfénadone Les résidus de la première couronne sont représentés en sphères de Van der Walls orange, l'analogue de terfénadone et l'hème en bâton.

IV.3.4.5 Bilan de l'arrimage des analogues de terfénadone

Les expériences d'arrimage des dérivés de terfénadone permettent de mieux comprendre les résultats expérimentaux et notamment la régiosélectivité d'hydroxylation. De plus l'approche par modélisation moléculaire permet d'identifier les voies d'accès et les résidus clef impliqués dans la reconnaissance du substrat :

1. **L'accès des analogues de terfénadone** au site actif du CYP2U1 est différent de celui observé pour le CYP2J2 et se fait par **deux canaux voisins** (les canaux 2f et 2ac).
2. **Chaque canal d'accès du CYP2U1 possède ses propres résidus polaires** capables de lier le substrat terfénadone par liaison hydrogène et ainsi fixer son enfouissement.
3. Au voisinage du site actif, l'environnement hydrophobe du site actif assure l'essentiel des interactions de la partie aliphatique des substrats et la **phénylalanine 167 crée une interaction de type π -stacking** qui maintient la position benzylique du substrat à proximité du fer de l'hème.
4. **Un site actif moins contraint que celui du CYP2J2** conduit à des **hydroxylations moins régiosélectives** que celles observées avec le CYP2J2, la chaîne aliphatique terminale des analogues de terfénadone étant relativement mobile au voisinage de l'hème.
5. L'un des deux canaux d'arrimage, le 2f, était présenté en partie II (page 88) comme majoritairement ouvert pour le CYP2U1 et sous contrôle de l'insert 2 N-terminal.

IV.4 Conclusions

Au cours de cette thèse, environ 70 molécules ont été testées comme substrats potentiels du CYP2U1.

La recherche de nouveaux substrats pour le CYP2U1 a permis de découvrir **les deux premiers substrats exogènes**, à savoir la débrisoquine, un substrat du CYP2D6, d'une part et les analogues de la terfénadone, connus pour être oxydés par le CYP2J2, d'autre part. Ces deux substrats s'ajoutent aux premiers composés endogènes (acide arachidonique, DHA, EPA) qui ont été proposés comme substrats du CYP2U1 (Chuang, Helvig et al. 2003). Ceci suggère que le CYP2U1 serait capable de transformer une large diversité de composés.

D'un point de vue chimique, ces deux familles de molécules n'ont pas grand-chose en commun, la débrisoquine étant une petite molécule ($M=175 \text{ g.mol}^{-1}$) chargée positivement alors que les analogues de terfénadone sont de longues molécules plus volumineuses ($M= 442\text{g.mol}^{-1}$ pour l'éthylterfénadone

par exemple) et plus hydrophobes. De plus, la régiosélectivité d'hydroxylation observée pour les deux substrats diffère de celle relevée pour les P450s 2D6 et 2J2. Le CYP2U1 transforme majoritairement la débrisoquine en 1-hydroxydébrisoquine alors la 4-hydroxydébrisoquine est le produit majoritaire en présence de CYP2D6 et on observe l'oxydation majoritairement en position benzylique des analogues de terfénadone et donc une régiosélectivité vis-à-vis de ces composés opposée à celle observée avec le CYP2J2.

Un travail d'arrimage moléculaire de ces substrats au sein du site actif de l'enzyme modélisé et optimisé avec une membrane a alors permis d'**expliquer cette régiosélectivité** particulière.

Du fait de sa petite taille, la débrisoquine interagit uniquement avec des résidus au cœur du site actif. Les résidus du CYP2U1 qui entrent en interaction avec la débrisoquine diffèrent des résidus clefs responsables du positionnement de la débrisoquine au sein du site actif du CYP2D6. Cependant, l'analyse des différentes poses d'arrimage a permis de mieux comprendre la régiosélectivité d'hydroxylation (en position 1, 4 et 6) observée pour le CYP2U1.

Les dérivés de terfénadone s'associent quant à eux à la protéine au sein des canaux d'accès 2ac et 2f et donc, dans un domaine structural différent de celui observé pour le CYP2J2. L'interaction protéine/substrat est caractérisée par un jeu de liaisons hydrogènes dans le canal d'accès associé à des interactions hydrophobes à proximité de l'hème. La régiosélectivité d'hydroxylation majoritaire (en position benzylique) a ainsi pu être confortée par l'analyse des poses d'arrimages.

Toutefois les affinités observées expérimentalement pour ces deux catégories de substrat sont relativement faibles avec des K_M de l'ordre de la centaine de μM . Il en est de même pour les énergies d'interaction AUTODOCK, de l'ordre de quelques $kcal.mol^{-1}$, qui sont elles aussi faibles ce qui amène à penser que ces substrats sans doute peu représentatifs du CYP2U1. Ce sont cependant les deux seules activités disponibles aujourd'hui pour poursuivre l'exploration fonctionnelle.

A partir des activités enzymatiques décelées, la prochaine étape de ce projet sera de mettre au point un test d'activité afin d'évaluer de manière rapide et sensible un large jeu de molécules en tant que substrats potentiels dans le cadre d'une recherche de substrats plus spécifiques et à plus forte affinité pour ce P450 orphelin.

CHAPITRE V.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Comme cela avait été annoncé en fin de Chapitre I, l'objectif principal de cette thèse était de mieux caractériser le CYP2U1, cytochrome P450 humain orphelin, principalement exprimé dans le cerveau et le thymus et dont le rôle biologique reste largement inconnu. De façon plus précise, les trois objectifs à court terme étaient (i) d'étudier les particularités structurales du CYP2U1, (ii) de mettre au point un système d'expression hétérologue d'une enzyme catalytiquement active et (iii) de rechercher de nouveaux substrats.

Pour atteindre le premier objectif, des modèles de CYP2U1 ont été construits par homologie. L'alignement de séquences protéiques préalable à la modélisation a laissé apparaître une particularité pour le CYP2U1 : la présence de deux inserts dans son domaine N-terminal. Ceux-ci, totalement inédits, ne possèdent aucune séquence homologue référencée dans les bases de données. Les modèles générés ont été incorporés à une membrane modèle afin notamment d'étudier l'influence de ses inserts sur l'ancrage à la membrane. Cette étude a mis en évidence l'interaction des résidus polaires et chargés (notamment des arginines) de l'insert 2 avec les groupes phosphates de la membrane. Cet insert pourrait alors offrir un ancrage supplémentaire du CYP2U1 à la membrane ou servir au recrutement des substrats de l'enzyme à l'interface membrane/cytosol.

La **topologie du site actif a été étudiée** en détail sous deux aspects au cours de la dynamique avec en premier lieu un calcul du volume du site actif qui se situe pour le CYP2U1 dans la moyenne des volumes de sites calculés pour les autres P450s de mammifères. Puis l'étude des canaux d'accès et de leur dynamique d'ouverture montre que les canaux d'accès au substrat sont principalement dirigés vers la membrane ou à son interface. Le **canal 2f se trouve en interaction avec l'insert 2** et est celui qui présente le taux d'ouverture le plus important. C'est donc, pour nous, le canal privilégié pour l'entrée des substrats.

Le second objectif a été atteint avec la **co-expression dans la levure *S. cerevisiae* du CYP2U1 avec la P450 réductase humaine**. L'optimisation des conditions de culture conduit à la production d'un complexe de protéines membranaires CYP2U1-P450 réductase catalytiquement actif.

Le troisième objectif de recherche d'activité catalytique du CYP2U1 a été atteint avec la découverte **des deux premiers substrats exogènes de l'enzyme** après un screening de plus de 70 composés substrats des P450s de la famille 2 :

- la débrisoquine, un substrat du CYP2D6,
- des analogues de la terfénadone, substrats CYP2J2.

Pour ces deux substrats, la régiosélectivité d'hydroxylation a été déterminée. La débrisoquine est majoritairement hydroxylée en position 1 (position benzylique) et les analogues de terfénadone sont oxydés sélectivement sur la position benzylique. Dans les deux cas, la position la plus réactive vis-à-vis de l'oxydation est celle qui est majoritairement oxydée. Nous avons aussi effectué des expériences d'arrimage moléculaire de ces molécules dans le site actif du CYP2U1. L'utilisation des modèles donne une première approche en 3D de ce que pourrait être le site actif de ce P450 et fournit une explication de la régiosélectivité surprenante du CYP2U1 évoquée précédemment avec un arrimage dans le cœur du site actif pour la débrisoquine et dans deux canaux (2f et 2ac) pour les analogues de terfénadone.

L'utilisation future de notre modèle devrait permettre de mettre au point des substrats et/ou inhibiteurs encore plus affins et sélectifs du CYP 2U1. De même, son utilisation devrait aussi être très utile pour savoir quelles molécules endogènes sont les plus susceptibles d'être substrats, ou, de façon plus générale, d'interagir efficacement avec le CYP2U1. Ceci devrait permettre de déterminer les différents rôles de ce P450 humain.

Par ailleurs des constructions (chimères) introduisant des éléments de structure des CYP2J2 et 2D6 au site actif du CYP2U1 permettraient de valider les modèles obtenus.

L'analyse poussée de l'influence de l'insert 2 sur l'activité du CYP2U1 devra se poursuivre avec l'expression d'une enzyme pour laquelle ce domaine aura été tronqué et avec la détermination de la structure 3D de cet insert (par cristallisation de la protéine ou par l'analyse RMN du peptide).

.

CHAPITRE VI.

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

VI.1 Méthodes Bioinformatiques

VI.1.1 Génération de modèles par homologie et leur évaluation

VI.1.1.1 Méthodologie générale

Au préalable, un alignement de séquences protéiques des templates a été effectué avec Muscle (Edgar 2004) ainsi qu'un alignement structural sous Mustang (Konagurthu, Whisstock et al. 2006).

Les différents modèles ont été générés par Modeller v9.8 (Eswar, Webb et al. 2006). Les 500 modèles de cytochrome P450 générés ont été évalués par la fonction de score énergétique de Modeller : le DOPE score (discrete optimized protein energy). Une sélection plus poussée des 5 meilleurs modèles (DOPE score les plus bas) sur le serveur d'analyse structurale et de vérification (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>) permet d'éliminer, le cas échéant, des modèles en vérifiant différents paramètres : la stéréochimie de la structure est évaluée résidu par résidu par PROCHECK (Laskowski, Macarthur et al. 1993); d'autres paramètres stéréochimiques sont évalués par WHAT_CHECK (Hooft, Vriend et al. 1996) ; ERRAT (Colovos and Yeates 1993) analyse la statistique des interactions non covalentes dans les modèles et la compare à ce qui est retrouvé dans les structures connues de la PDB ; VERIFY_3D (Bowie, Luthy et al. 1991) évalue la compatibilité de la structure tridimensionnelle du modèle avec le type structural (hélice alpha, feuillet beta, boucle,...) déterminé pour chaque résidu à partir de la séquence ; PROVE (Pontius, Richelle et al. 1996) calcule le volume des atomes du modèle selon une méthode qui traite les atomes comme des sphères puis calcule un Z-score du modèle qui peut être comparé à ceux issus des structures PDB.

VI.1.1.2 Modélisation du domaine N-terminal du CYP2U1

Il n'existe aujourd'hui aucune structure cristallographique de P450 avec son hélice transmembranaire, il est donc impossible de modéliser celle-ci par homologie.

Le domaine N-terminal est reconstitué grâce au serveur I-TASSER (*Iterative Threading Assembly Refinement Algorithm*) (Roy, Kucukural et al. 2010) qui effectue en premier lieu une prédiction de structure secondaire afin de localiser l'hélice sur la séquence protéique puis celle-ci est reconstruite *ab*

initio (Wu, Skolnick et al. 2007). La position de l'hélice transmembranaire définie par I-TASSER correspond à la localisation des autres logiciels de prédiction de structure (voir partie II.1.2.2 p 52).

Les deux modèles (domaine N-terminal & modèle construit par homologie) sont alors assemblés manuellement sous Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4, Schrödinger, LLC.). Une minimisation sous contrainte est effectuée sous Sybyl 8.0 : tous les résidus sont figés hormis les 3 acides aminés situés de part et d'autre de la nouvelle liaison peptidique. Cette procédure permet d'éviter tout clash stérique entraîné par la liaison du domaine transmembranaire au reste de la protéine.

VI.1.2 Recuits simulés sous Rosetta

Les expériences de recuit simulé sont effectuées sous Rosetta 3.1 (module loopmodel) (Wang, Bradley et al. 2007). Les calculs sont effectués sur le cluster de la Direction du Vivant du CEA.

La méthode utilisée (*kinematic closure*) est inspirée des cinétiques inverses utilisées en robotique : les extrémités du segment peptidique à replier sont fixes et la chaîne peptidique est ouverte entre deux résidus. 2N-6 torsions angulaires (Phi-Psi) des N résidus à modéliser sont arbitrairement fixées (pour chaque résidu, les valeurs angulaires initiales sont celles retrouvées le plus fréquemment dans les structures cristallographiques – i.e. valeurs canoniques). Les 6 autres angles de torsion sont calculés par l'algorithme de *kinematic closure* afin de générer de nouvelles conformations qui subissent un recuit simulé. Ce calcul est répété en itération au sein d'un algorithme de Metropolis Monte Carlo.

VI.1.3 Dynamiques moléculaires sous AMBER

Le champ de force AMBER est utilisé pour relaxer les modèles générés par Modeller. Les différentes étapes sont effectuées avec les logiciels de la suite AMBER : LEaP, Sander et Ptraj.

VI.1.3.1 Préparation des modèles

La préparation des modèles s'effectue avec le logiciel LEaP qui génère les fichiers de coordonnées (.pdb et .crd) et de topologie (.top) nécessaires pour la dynamique moléculaire.

La cystéine liant l'hème d'abord renommée en un nouveau résidu noté CYQ (afin de permettre sa liaison avec le fer de l'hème), les paramètres de topologie et de charge des autres résidus sont ceux de la librairie Amber ; les paramètres de l'hème sont ceux définis par A. Oda (Oda, Yamaotsu et al. 2005) spécialement pour l'étude des P450s. Ils sont donnés en annexe p. 177.

Le modèle est hydraté avec une « boîte » de la forme d'un octaèdre tronqué de molécules d'eau de type TIP3P. La distance minimale entre un résidu du P450 et l'extrémité de la boîte est de 9Å. Des ions (Na⁺ ou Cl⁻) sont ajoutés afin d'assurer l'électroneutralité du modèle.

VI.1.3.2 Minimisation et équilibration

Avant toute dynamique, les modèles sont minimisés et équilibrés selon la séquence suivante :

1. Quatre étapes de minimisation. Chaque étape se décompose en 100 cycles de minimisation effectués avec méthode de la phase stationnaire suivis de 1000 cycles avec la méthode de la plus forte pente.
2. Une étape de chauffage : la température passe progressivement, à volume constant, de 0 à 300K en 50 ps. Les liaisons impliquant des atomes d'hydrogène et l'eau sont gelées.
3. Une étape de relaxation : les liaisons impliquant des hydrogènes et l'eau restent gelées, le modèle est relaxé 50 ps à 300K.
4. Deux étapes d'équilibration : chacune des étapes correspond à 50 ps au cours desquelles le modèle est équilibré à pression constante sans contrainte.

VI.1.3.3 Etapes de dynamique moléculaire

La production de la dynamique moléculaire est effectuée à pression constante et sans contrainte. Une dynamique comprend 5 étapes successives de 2 ns chacune avec un pas de 2 ps (les dynamiques ont donc une durée totale de 10 ns). Une structure est enregistrée à chaque pas.

VI.1.4 Dynamiques moléculaires sous CHARMM

Les dynamiques en membranes ont été effectuées après paramétrisation de la protéine, de la membrane et du solvant sous le champ de force CHARMM c35b2 (Brooks, Brooks et al. 2009).

VI.1.4.1 Préparation des modèles

Le protocole utilisé pour préparation des modèles membranaire est inspiré du tutoriel « Membrane Proteins Tutorial » diffusé par l'université de l'Illinois. (<http://ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/>). Il se décompose en six étapes (Figure VI-1):

1. La protéine est orientée afin que l'axe Z soit perpendiculaire à la surface.
2. Un fichier de topologie (psf) de la protéine et de son hème est généré.

3. La protéine est solvatée avec une couche d'eau d'épaisseur 3Å – logiciel Solvate (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry ¹)
4. Une partie de l'eau est retirée afin de laisser insérer la membrane
5. La membrane est insérée et alignée sur la protéine
6. Le complexe est solvaté et les ions sont ajoutés sous VMD.

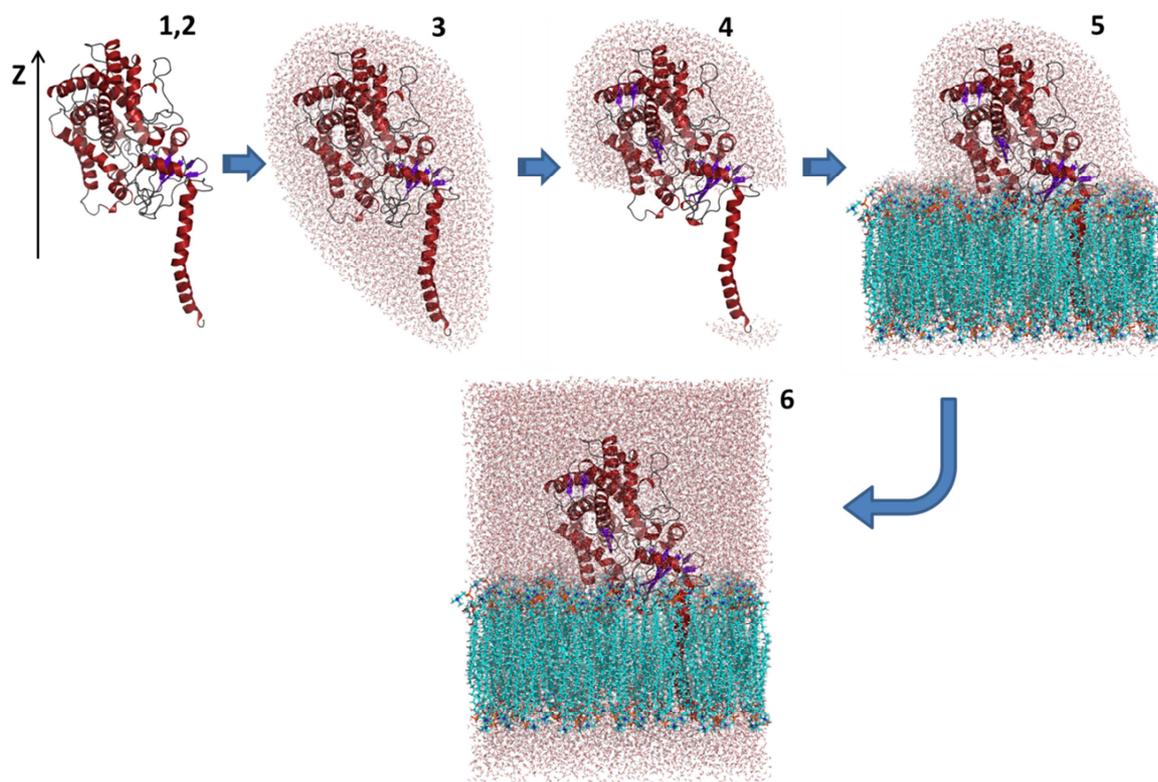


Figure VI-1 : Les étapes de la construction d'un modèle en membrane. La protéine est représentée en cartoon, les molécules d'eau et les phospholipides en bâtons.

VI.1.4.2 Minimisation et équilibration

Avec plus de 100000 atomes pour les modèles de CYP2U1 avec membrane, il est inconcevable de lancer une dynamique sur une structure non minimisée et équilibrée. Différentes étapes permettent d'obtenir un modèle stable.

1. Seules les molécules d'eau sont libres. Une minimisation de 5000 pas est effectuée (0.01 ns) suivie d'une équilibration de 1 ns.

¹ <http://www.mpibpc.mpg.de/home/grubmueller/downloads/solvate/index.html>

2. L'eau ainsi que les lipides (excepté leurs têtes polaires) sont libres. Une minimisation de 5000 pas est effectuée (0.01 ns) suivie d'une équilibration de 1ns.
3. L'eau ainsi que la totalité des lipides sont libres. Une minimisation de 250000 pas est effectuée (0.5 ns) suivie d'une équilibration de 2 ns.
4. Tous les atomes sont libres. Une minimisation de 250000 pas est effectuée (0.5 ns) suivie d'une équilibration de 2 ns.

VI.1.4.3 Dynamiques courtes (<20 ns)

Les calculs sont effectués sur le cluster de la Direction du Vivant du CEA (Gabriel – 24 nœuds de calculs) en utilisant de 1 à 64 processeurs.

La dynamique s'effectue sous NAMD version 2.6b1 (Phillips, Braun et al. 2005)

VI.1.4.4 Dynamiques longues (>20 ns)

Les dynamiques de plus de 20 ns qui auraient demandé plus d'un mois de calcul sur le cluster de la Direction du Vivant sont effectuées grâce au Centre de Calcul Recherche et Technologie (CCRT – Bruyère-le-Châtel) et ce, sur les clusters Platine & Titane équipés de 1068 nœuds de calculs.

La dynamique s'effectue avec NAMD version 2.7b2 (Phillips, Braun et al. 2005)

VI.1.5 Analyse des fichiers de dynamique

L'exploitation des fichiers de dynamique moléculaire se fait avec le logiciel Ptraj (inclus dans la suite de logiciels AmberTools) (Case, Darden et al. 2010). Ce logiciel permet d'analyser l'ensemble d'une dynamique et d'exporter diverses données :

- ❖ Des poses (fichiers pdb) extraites en cours de dynamique,
- ❖ des mesures de distances et d'angles,
- ❖ la déviation de la structure de la protéine mesurée par rapport à une structure de référence qui est mesurée par son RMSD (root mean square deviation), avec :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_{réf})^2}$$

N nombre total d'atomes, r_i coordonnées de l'atome i , $r_{réf}$ coordonnées de l'atome de référence

- ❖ la fluctuation d'un résidu mesurée le long de la dynamique par son RMSF (root mean square fluctuation).

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{K} \sum_{j=2}^K (r_{i,j} - r_{i,j-1})^2}$$

K nombre total de poses, $r_{i,j}$ coordonnées de l'atome i au temps j

- ❖ la compacité d'une structure mesurée par le rayon de giration. Il est donné en nm et défini par la relation suivante (Lobanov, Bogatyreva et al. 2008):

$$R_G = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{j=1}^N m_j (r_j - r_i)^2}$$

N nombre total d'atomes, r_i coordonnées du centre de masse, r_j coordonnées de l'atome j, m_j masse de l'atome j, M masse des N atomes

VI.1.6 Evaluation des canaux d'accès des substrats

- ❖ Présentation du programme

Le programme MOLE v1.2 (Petrek, Kosinova et al. 2007) disponible sur le site de l'université de Masaryk (République Tchèque) permet de localiser et de caractériser les tunnels ou canaux d'accès au site actif. Contrairement à d'autres programmes plus anciens, tel que CAVER (Petrek, Otyepka et al. 2006), ce logiciel présente l'avantage de pouvoir calculer rapidement la localisation des canaux d'accès d'une structure protéique (*i.e.* en moins d'une minute).

MOLE recherche les canaux d'accès par le biais d'un algorithme de Dijkstra qui calcule le chemin le plus court et le plus large de sortie à partir d'un point donné du site actif (voir Figure VII 1). Pour chaque tunnel trouvé par MOLE deux informations sont collectées : le chemin d'accès et la largeur maximale du tunnel en chaque point.

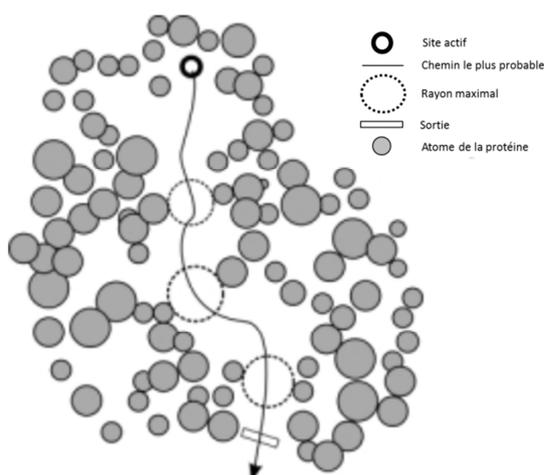


Figure VII 1 : Détermination des canaux d'accès au site actif – principe schématique.

❖ Paramètres d'entrée

Le point de départ du calcul de canaux doit être un point de la cavité. Il est habituellement défini de visu par l'utilisateur. Afin de pouvoir traiter un grand nombre de calculs, la recherche manuelle n'est plus envisageable. Les coordonnées du point initial sont calculées afin de correspondre au barycentre entre le fer de l'hème et le C α d'un résidu situé sur le toit du site actif, la leucine 203 avec des pondérations de 2 pour le fer et 1 pour le carbone (ce résidu particulier –L203- a été choisi du fait de sa position sur le toit du site actif et parce qu'il est peu mobile lors des étapes de simulation).

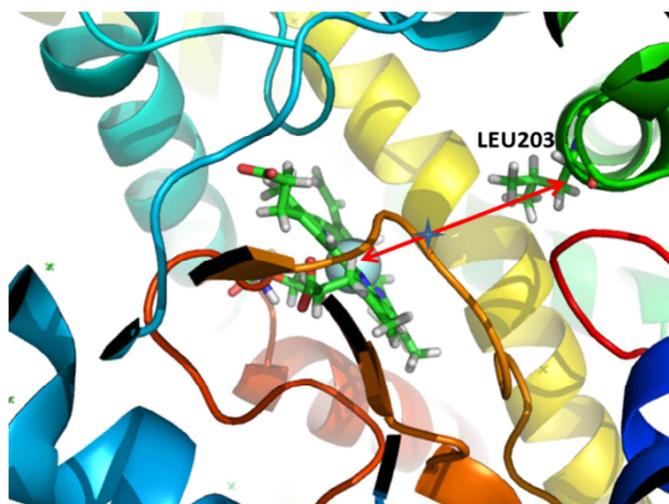


Figure VI-2 : Représentation du point de départ des calculs Mole (Kleywegt and Jones 1994)Voidoo (croix bleue). La leucine 203 et l'hème sont représentés en bâton, la protéine en cartoon et le fer par une sphère.

VI.1.7 Evaluation du volume du site actif

❖ Présentation du programme

Le programme VOIDOO, disponible sur le site de l'université d'Uppsala en Suède permet la détection de cavités au sein d'une structure tridimensionnelle. Son algorithme lui permet de détecter des cavités même si celles-ci sont, comme dans le cas des CYPs, ouvertes vers l'extérieur via des canaux d'accès. Dans tous les cas, la technique consiste à effectuer un balayage du site actif par une sphère qui sert de sonde, dont le rayon peut être défini par l'utilisateur. Deux surfaces peuvent alors être calculées. Par intégration, les deux volumes respectifs pourront être calculés.

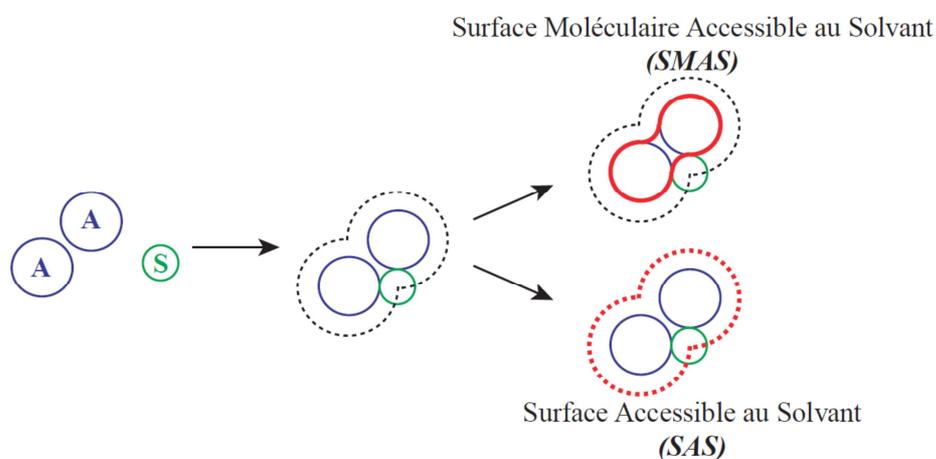


Figure VI-3 : Surfaces moléculaires d'un composé A définies par le solvant S. Le solvant explore tous les positionnements possibles autour de A. La surface moléculaire accessible au solvant est définie par les contacts de Van Der Walls entre la sonde S et le composé A (Connolly 1983). La surface accessible au solvant est définie par la surface balayée par le centre de la sonde (Lee and Richards 1971)

❖ Paramètres d'entrée de Voidoo

Le point de départ du calcul du volume est nécessairement un point de la cavité. Les coordonnées de ce point sont les même que celles utilisées pour le calcul des canaux d'accès au site actif.

Les principaux paramètres sont listés dans le tableau suivant :

Paramètre	Valeur
définition de la grille	0.3 Å
rayon de la sonde	1.4 Å
taille minimale de la cavité	100 Å ³
nombre maximum de cycles de détection	10
nombre maximum de cycles de raffinement	15
critères de convergence	0.1 Å ³ ou 0.1% du volume de la cavité

Tableau VI-1 : Paramètres utilisés pour le calcul de volume de site actif par Voidoo

VI.1.8 Docking de petites molécules dans le site actif des cytochromes P450

❖ Présentation du programme

Les expériences d'arrimage moléculaire ont été effectuées avec AUTODOCK 4.2 (Morris, Huey et al. 2009). Le ligand et les résidus flexibles subissent aléatoirement des mouvements de rotations et de translation et cette exploration conformationnelle est contrôlée par un algorithme de Monte Carlo afin d'obtenir des conformations de faibles énergies (Goodsell, Morris et al. 1996).

Puis une étape d'attribution de score permet de classer énergétiquement les poses obtenues. AUTODOCK évalue donc l'énergie libre associée à la formation du complexe enzyme-substrat (Huey, Morris et al. 2007). A cet effet, les énergies sont évaluées par paires ($V_{lié} - V_{non lié}$) : les deux premières paires correspondent aux interactions intramoléculaires, la troisième aux interactions intermoléculaires (voir équation ci-dessous). Chaque terme énergétique V correspond à la somme de 5 termes énergétiques (Van Der Walls, diélectrique, solvation, torsion et liaison hydrogène).

$$\Delta G = (V_{lié}^{L-L} - V_{non lié}^{L-L}) + (V_{lié}^{P-P} - V_{non lié}^{P-P}) + (V_{lié}^{L-P} - V_{non lié}^{L-P}) - T\Delta S$$

L : ligand, P : protéine

Le champ de force utilisé pour l'évaluation énergétique est de type semi-empirique, sa calibration a été effectuée grâce aux constantes d'associations de 188 complexes enzymes-substrats déposés dans la *Ligand Protein DataBase* (LPDB) (Roche, Kiyama et al. 2001) assurant ainsi une déviation standard de seulement 2.62 kcal/mol pour les calculs de scores.

❖ Préparation des fichiers de coordonnées

Les ligands sont générés avec MAESTRO (version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) . Les charges partielles sont rajoutées avec le champ de force OPLS-2005. Pour chaque ligand, 10 conformères sont générés grâce au module ConfGen (Watts, Dalal et al. 2010).

Les charges partielles des atomes du récepteur sont elles aussi ajoutées avec le champ de force OPLS-2005.

❖ Calcul de la grille

Une partie des atomes du récepteur sont considérés comme rigides lors de l'expérience d'arrimage moléculaire. Pour ceux-ci, une carte tridimensionnelle des énergies d'interaction (qui sont donc constantes) est calculée au préalable. Pour l'arrimage des substrats au CYP2U1, cette carte, appelée grille, est un cube de 126 points de côté, chaque point étant espacé de 0.2Å (afin de conserver une bonne résolution) et la grille est centrée sur le site actif de l'enzyme (voir Figure VI-4). Pour les plus grosses molécules (type ethylterfénadone), la taille de la grille est augmentée et englobe les canaux d'accès au site actif.

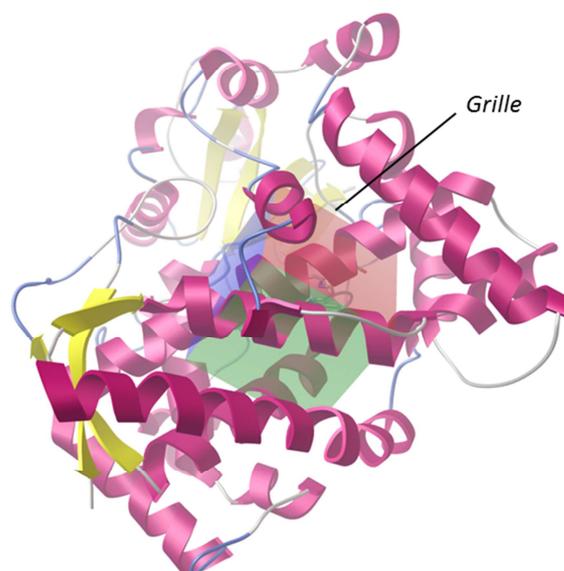


Figure VI-4 : Exemple de grille AUTODOCK pour le CYP2U1. La protéine est représentée en cartoon rose et jaune, la grille est un cube centré sur le site actif de l'enzyme

❖ Paramètres d’arrimage

Pour chaque conformation du ligand, 100 recherches conformationnelles ont été réalisées par l’algorithme proposé par AUTODOCK. Les 1000 poses obtenues sont ensuite évaluées énergétiquement.

❖ Analyse des résultats

Le produit d’arrimage est ensuite analysé grâce au logiciel AUTODOCK Tolls. Les différentes poses sont regroupées selon leur proximité conformationnelle sous formes de clusters de poses. Les interactions ligand protéine sont ensuite analysées pour les clusters de plus basse énergie et regroupant le plus grand nombre de poses.

VI.2 Méthodes Biochimiques et Analytiques

VI.2.1 Milieux de culture et tampons

Milieux Nutritifs pour <i>S. cerevisiae</i>		
SGI	Bactocasaminoacids	1 g
	Yeast Nitrogen Base	7 g
	Glucose	20 g
	Eau	<i>q.s.p. 1 L</i>
YPGA	Yeast Extract	10 g
	bactopeptone	10 g
	Adenine	15 mg
	Glucose	20g
	Eau	<i>q.s.p. 1 L</i>

Milieux Nutritifs pour <i>E. coli</i>		
TB	Tryptone	12 g
	Yeast Extract	24 g
	Glycerol	4 mL
	Tampon phosphate 1M	100 mL
	Eau	<i>q.s.p. 1 L</i>
LB	Tryptone	10 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	10 g
	Eau	<i>q.s.p. 1 L</i>

Tableau VI-2 : Composition des milieux de culture. Les milieux solides sont de même composition hormis un ajout de 15 g d’agar par litre.

VI.2.2 Expression de la protéine recombinante dans *Saccharomyces cerevisiae*

VI.2.2.1 Souches et vecteur

Les **souches** W(hR) et W(R) ont été construites par l'équipe de Denis Pompon au centre de Génétique Moléculaire (Gif sur Yvette, France). Ces deux souches sont dérivées de la souche sauvage W(303-1B), W(R) surexprimant la P450 réductase de levure et W(hR) la P450 réductase humaine.

W(303-1B) ou W(N) : souche sauvage exprimant la P450 réductase ainsi que le cytochrome b5 endogènes (Thomas and Rothstein 1989) de génotype MAT a ; ade2-1 ; his3-11, 15 ; leu2-3,-112 ; ura3-1 ; trp1-1

W(R) : souche dérivée de W(303-1B) surexprimant la P450 réductase de levure (Truan, Cullin et al. 1993) et exprimant le cytochrome b5 endogène de génotype MAT a ; ade2-1 ; his3-11, 15 ; leu2-3,-112 ; ura3-1 ; trp1-1 ; YRED :: [ura3⁻-GAL10-CYC1-YRED]. Cette souche a été obtenue après introduction d'un promoteur inductible fort en amont du gène de la P450 réductase endogène.

W(hR) : souche dérivée de W(303-1B) surexprimant la P450 réductase humaine (Urban, Truan et al. 1993) et exprimant le cytochrome b5 endogène de génotype MAT a ; ade2-1 ; his3-11, 15 ; leu2-3,-112 ; ura3-1 ; trp1-1 ; YRED :: [ura3⁻-GAL10-CYC1-HRED]. Cette souche a été obtenue après disruption du gène de la P450 réductase endogène et son remplacement par celui de la P450 réductase humaine sous contrôle d'un promoteur inductible fort en son amont.

L'ADNc de la protéine (544 a.a.) est inséré dans le **vecteur d'expression pYeDP60** (Figure VI-5). Ce vecteur navette *E.coli* / *S. cerevisiae* multicopie dont la cassette d'expression est sous le contrôle d'un promoteur inductible fort GAL10 et du terminateur de PGK. D'une part, une origine de réplication bactérienne ORI ainsi que le gène de sélection AMPR (gène de résistance à l'ampicilline) permettent l'utilisation d'*E. coli* pour le clonage. D'autre part, un gène de sélection de levure ORI 2μ et deux marqueurs de sélection (URA3 et ADE2, gènes essentiels à la biosynthèse respectivement de l'uracile et de l'adénine, nucléotides essentiels absents des milieux de culture) permettent l'utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme hôte d'expression du cytochrome P450.

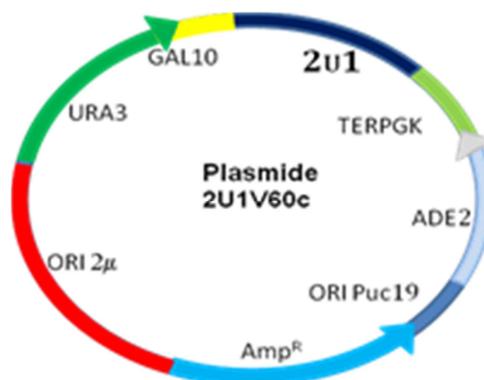


Figure VI-5 : Vecteur d'expression pYeDP60 portant l'ORF du CYP2U1

VI.2.2.2 Transformation de la levure

Les cellules compétentes (*S. cerevisiae* W(R) ou W(hR)) sont préalablement incubées en présence d'acétate de lithium et de sperme de saumon à 30°C pendant 60 minutes. Le plasmide est alors introduit au sein des levures compétentes grâce à un choc thermique à 42°C de 15 min.

Les levures sont alors étalées sur milieu minimum solide (SGI) supplémenté en tryptophane (0.3 mg/mL) afin de sélectionner les colonies ayant intégré le plasmide et laissées à incuber 2 à 3 jours à 28°C.

VI.2.2.3 Précultures

Les étapes de préculture, dans des volumes croissants (10 mL puis 50 mL) favorisent la croissance des cellules.

En effet, peu concentrées, les levures se divisent lentement et après cette phase de latence, on observe une phase de croissance exponentielle jusqu'à épuisement du milieu. Il convient donc toujours de se placer dans des conditions de croissance exponentielle et ce paramètre peut être suivi grâce à une mesure de la densité optique (D.O.) à 600 nm.

Deux autres paramètres influent sur les étapes de préculture et de culture : la température et l'agitation qui sont idéalement calibrées à 28°C pour une agitation de 180 tour.min⁻¹.

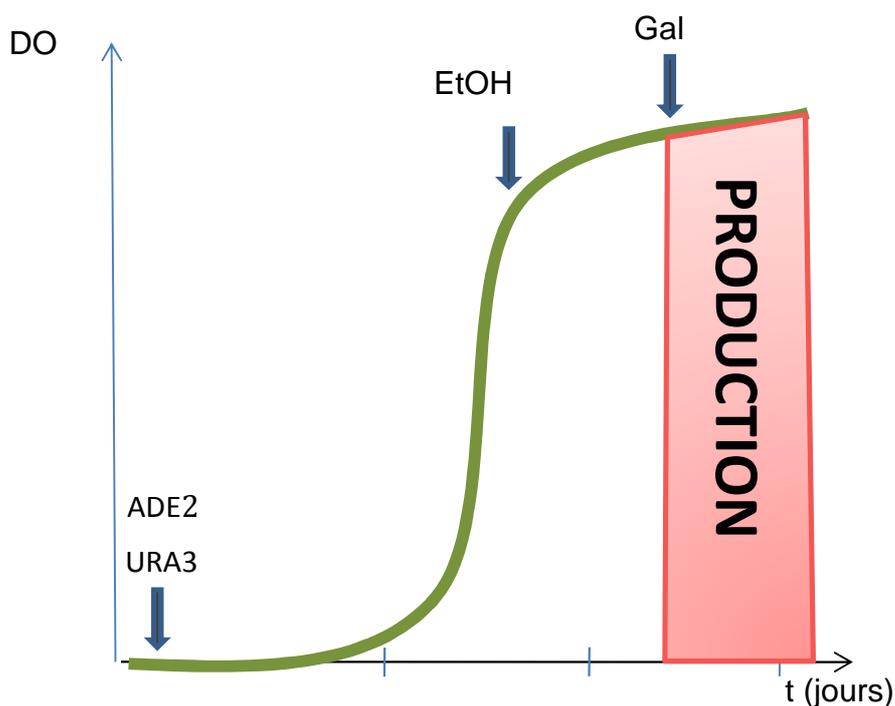


Figure VI-6 : Suivi de la densité optique lors de culture de levure *S. Cerevisiae*. La sélection des levures ayant intégré le plasmide se fait en début de culture grâce aux gènes de synthèse de l'adénine et de l'uracile du plasmide V60 (le milieu de culture n'est pas implémenté en ces acides aminés). Lorsque la DO atteint la valeur 3, de l'éthanol est ajouté au milieu et la production commence 12 heures après par l'ajout de galactose (2% m/v final)

VI.2.2.4 Culture et induction

La culture est effectuée dans des erlenmeyer d'un volume de 200 mL de milieu SGI supplémenté en tryptophane (0.3 mg/mL) à 28°C et la D.O. est suivie jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur de 3. La croissance est poursuivie une nuit après ajout de 180 mL de milieu YE(2X) et 20 mL d'éthanol afin de consommer le glucose présent dans le milieu tout en assurant la survie des levures (l'éthanol se substituant au glucose comme source de carbone).

La surexpression du CYP2U1 est alors induite par le galactose (2% m/v final). Neuf heures après l'induction, les levures sont centrifugées à 8000 tours.min⁻¹ pendant 6 minutes (centrifugeuse Beckman).

VI.2.2.5 *Obtention de la fraction microsomale*

La fraction microsomale est obtenue par centrifugation différentielle. Toutes ces opérations s'effectuent à 4°C.

Le culot de levures ayant exprimé la protéine d'intérêt est tout d'abord repris dans un tampon Tris-EDTA-Sorbitol (Tris 0.1M – EDTA 5mM – Sorbitol 0.6M, pH 7.5). Les cellules sont alors cassées mécaniquement par des billes de verre (0,45-0,5 mm ; Braun Biotech International) en agitant à l'aide d'un broyeur (6 broyages de 30s entrecoupés de 1min le tout à 4°C). Les billes sont ensuite éliminées sur fritté.

Le broyat est ensuite centrifugé 35 min à 15000 tours.min⁻¹ à 4°C afin de séparer les débris cellulaires (noyaux, parois, mitochondries) présents dans le culot, du cytosol et des microsomes.

Le surnageant est centrifugé à 35000 tours.min⁻¹ à 4°C pendant 1h30 puis le culot de fraction microsomale est homogénéisé dans un tampon Tris 50mM, EDTA 1mM, glycérol 20%, pH 7,4. La suspension microsomale est ensuite aliquotée, congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

VI.2.3 *Expression de la protéine recombinante dans Escherichia coli*

VI.2.3.1 *Souches et vecteur*

Des souches de cellules DH5α (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) sont utilisées pour l'expression dans *E. coli*.

Le gène du CYP2U1 cloné dans le vecteur pCW (Figure VI-7) nous a été fourni par Xiao-Qiong Pei (Chengdu Institute of Biology, Chine).

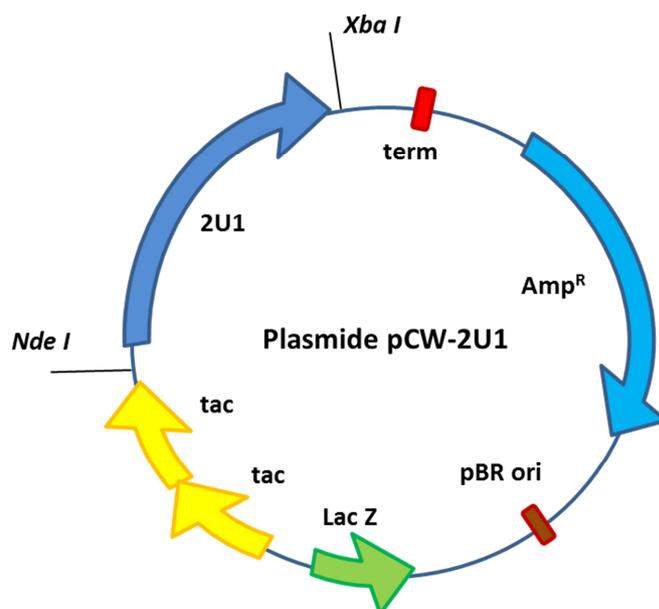


Figure VI-7 : vecteur d'expression bactérien pCW portant l'ORF du CYP2U1

L'ADNc est insérée dans le **vecteur d'expression pCW**. Ce vecteur d'*E.coli* multicopie dont la cassette d'expression est sous le contrôle de deux promoteurs tac inductibles à l'IPTG. D'un part, une origine de réplication bactérienne pBRori ainsi que le gène de sélection AMP^R (gène de résistance à l'ampicilline) permettent l'utilisation d'*E. coli* comme hôte d'expression du cytochrome P450.

De plus, il existe une version bicistronique de ce vecteur. Dans celle-ci, le CYP ainsi que la P450 réductase sont co-exprimés. Le gène codant la P450 réductase est inséré juste après celui du CYP2U1, les deux gènes se retrouvent sur le même transcrit d'ARNm.

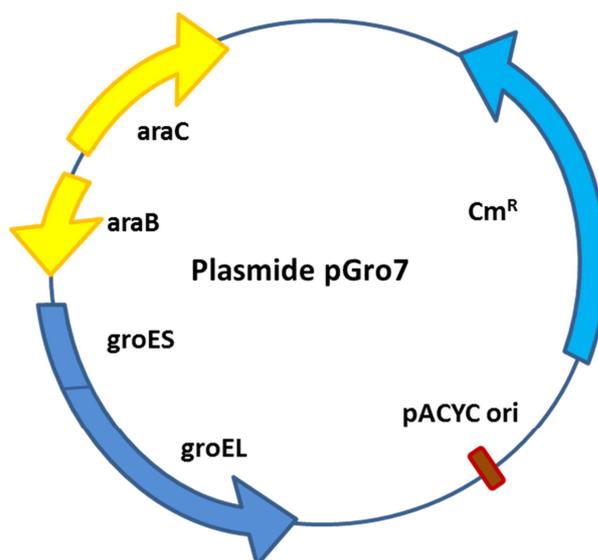


Figure VI-8 : vecteur d'expression bactérien pGro7

L'expression du CYP2U1 dans *E. coli* nécessite en outre la présence de protéines chaperonnes afin d'assurer un bon repliement du CYP2U1 dans le système hétérologue (Wu, Bartleson et al. 2006). Nous avons utilisé le plasmide pGro7 (Nishihara, Kanemori et al. 1998), fourni par Takara Bio Inc. (Japon). Ce vecteur possède un gène de résistance au chloramphénicol (Cm^R), une origine de répllication bactérienne (pACYC ori) et une cassette d'expression de la chaperonne groEL et de sa co-chaperonne groES sous le contrôle de deux promoteurs à l'arabinose (araB & araC).

VI.2.3.2 Transformation de la bactérie

Les cellules compétentes DH5 α (100 μl) sont préalablement incubées en présence de 50 ng des deux plasmides pGro7 et pCW-2U1 (version mono ou bicistronique) à 4°C pendant 30 minutes. Le plasmide est alors introduit au sein des levures compétentes grâce à un choc thermique à 42°C pendant 2 minutes suivies d'une incubation à 4°C pendant 5 minutes. 900 μL de milieu LB sont alors ajoutés et les cellules sont laissées 1 heure à 37°C. L'incubat est ensuite centrifugé à température ambiante à 10000 tour/min pendant 2 minutes et le culot est repris dans 100 μL de milieu LB.

Les bactéries sont alors étalées sur milieu LB supplémenté en antibiotiques (ampiciline 100 μM et chloramphénicol 50 μM) afin de sélectionner les colonies ayant intégré les deux plasmides et laissées à incuber une nuit à 37°C.

VI.2.3.3 Préculture-culture

A partir d'une unique colonie, une préculture sur une nuit est réalisée à 37°C dans 100 mL de milieu LB supplémenté d'ampicilline (100 µM) et de chloramphénicol (50 µM).

VI.2.4 Microsomes commerciaux exprimant les cytochromes P450 humains

Sauf mention contraire, les isoformes de CYP humains sont des Supersomes® de Gentest (BD Biosciences, CA, USA). Les protéines (CYP, réductase humaine et cytochrome b5) sont surexprimées dans des cellules d'insectes transfectées par baculovirus.

Le CYP2J2 est, quant à lui, surexprimé ainsi que la réductase humaine et le cytochrome b5 dans *E.coli* (bactosome) et nous a été fourni par Cypex (Royaume-Unis).

VI.2.5 Microsomes de foie de rat

Des rat males Sprague Dawley (200-250 g, Charles River, L'Arbresle, France) ont été fournis au laboratoire, nourris et abreuvés *ad libitum*. Après une période d'adaptation de 7 jours, les animaux ont été traités avec du phénobarbital (PB) (20 mg.kg⁻¹, i.p. pendant 4 jours). Les microsomes de rat ont été obtenus par centrifugation différentielle et stockés à -80°C jusqu'à utilisation. (Kremers, Beaune et al. 1981)

VI.2.6 Origine des molécules testées

La majorité des produits chimiques utilisés nous ont été fournis par Sigma-Aldrich.

Les analogues de terfénadone ont été synthétisés par S. Dijol et D. Buisson. Les métabolites de débrisoquine ont été synthétisés par Y. Xu-Li et J-L. Boucher pour les 5-,6- et 7-OH-débrisoquine, par J-L. Boucher pour les N-OH et urée débrisoquine et les 4- et 8-OH-débrisoquine nous ont été fournies par *Toronto Research Chemicals*.

VI.2.7 Conditions d'incubation pour les études métaboliques

Le milieu d'incubation contient initialement des cytochromes P450 microsomaux dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4 contenant de l'EDTA (1 mM) et du chlorure de magnésium (5 mM). Le substrat est préalablement dilué dans un solvant adéquat (DMSO, EtOH, eau). Le volume final de

solvant ajouté (si organique) ne dépasse pas 3% du volume final. La réaction enzymatique est démarrée par l'ajout d'une solution de NADPH (concentration finale de 1 mM) dans le mélange. L'incubation se fait à 28°C lors de l'utilisation de microsomes de levure (37°C dans le cas contraire) et, au temps désiré, la réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µL d'une solution précipitante à 4°C (CH₃CN/CH₃COOH, 10 : 1). Le mélange est ensuite vortexé puis centrifugé à 10000 tours.min⁻¹ pendant 5 minutes. Le surnageant (230-250 µL) est alors prélevé pour être injecté en CLHP-SM ou CLHP-fluorimétrie.

VI.2.8 CLHP-SM

L'appareil utilisé pour la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) est un système Surveyor couplé à un spectromètre de masse (SM) à trappe d'ion (Thermo Finnigan, Les Ullis, France). Les composés sont ionisés grâce à un dispositif d'électrospray (ESI) en mode positif. Une calibration des paramètres de détection est effectuée en utilisant la procédure automatique du logiciel Tune Plus (Thermo Finnigan, Les Ullis, France). Les paramètres utilisés pour la détection des différents composés sont indiquée dans le Tableau VI-3. La fragmentation des ions afin d'obtenir des spectres de SM² est réalisée à une puissance définie par l'appareil entre 30 et 40% selon le composé.

Composé	Température du capillaire (°C)	Voltage	
		source (kV)	capillaire (V)
Débrisoquine	200	4.5	3
Dér. Terfénadone	275	5	40

Tableau VI-3 : conditions de détection des différents composés par spectrométrie de masse

Produits et métabolites sont séparés par chromatographie en phase inverse sur une colonne Gemini C-18 (Phenomenex, Le Pecq, France). Les systèmes d'élution et les différents gradients sont présentés en annexe.

VI.2.9 Analyse des fractions microsomales

VI.2.9.1 Dosage des protéines microsomales

La concentration en protéines des microsomes est mesurée par la méthode de Bradford (Bradford 1976), en utilisant de l'albumine de sérum de bœuf comme étalon.

VI.2.9.1.1 Mesure de la concentration en CYP

Le dosage de la concentration en CYP ainsi que la mesure de l'activité réductase ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Cary300 (Varian) selon les méthodes spectroscopiques usuelles. (Guengerich, Martin et al. 2009)

La concentration en CYP est mesurée par spectroscopie différentielle. Les microsomes sont dilués dans du tampon (Tris-EDTA) au 1/30 afin de réduire la turbidité puis répartis dans deux cuves de 120 μL de 1 cm de trajet optique. Après enregistrement d'une ligne de base, le fer des CYPs est réduit (au degré d'oxydation +II) par quelques grains de dithionite. La solution de la cuve échantillon est alors saturée en CO par barbotage et le spectre d'absorption caractéristique des complexes $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}]$ mesuré. Les concentrations en CYP sont mesurées en se référant aux coefficients d'absorption des deux espèces ($\epsilon = 91000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ pour l'espèce absorbant à 450 nm et $\epsilon = 183000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ pour l'espèce absorbant à 420 nm).

VI.2.9.1.2 Mesure de l'activité réductase

L'activité mesurée est celle de la réduction du cytochrome C par la P450 réductase en présence de NADPH.

Les mesures de cinétique sont obtenues en utilisant deux cuves de 1 mL. La cuve de référence est remplie de tampon phosphate 10 mM pH 7.4. Dans l'autre cuve, sont introduits successivement 890 μL du même tampon phosphate, 80 μL d'une solution de cytochrome C à 0,5 mM, 30 μL de solution microsomale et 10 μM d'une solution de NADPH à 10 mM. Un suivi cinétique de l'absorbance à la longueur d'onde de 550 nm est alors effectué pendant 10 minutes. La pente de la courbe (ou variation de l'absorbance par minute – $\Delta A_{550\text{nm}}/\text{min}$) est mesurée. Elle est reliée à l'activité de la P450 réductase par la relation suivante :

$$\frac{\Delta A_{550\text{nm}}/\text{min}}{0.021} = \textit{nmol de cytochrome c réduit par minute dans la cuve}$$

Le facteur 0.021 correspond au coefficient d'absorption à 550 nm du cytochrome C réduit. On déduit alors l'activité réductase des microsomes en multipliant l'activité obtenue par le facteur de dilution (i.e. 1000/30).

VI.2.9.2 Immunodétection Western Blot

Un dépôt de 45 µg de fraction microsomale est effectué sur gel de polyacrylamide 12% SDS (gel readygel Biorad) en conditions dénaturantes. Les protéines sont séparées sous une tension de 200 V pour 170 mA pendant 1h. Les protéines sont alors transférées sur une membrane Hybond P par transfert semi-sec (Transblot semi-Dry cell Biorad) sous une tension de 20 V pour 170 mA pendant 1h30. La membrane est alors incubée 1h dans du lait PBS-Tween 5% (phase de blocage). Une seconde incubation d'une heure est effectuée dans du lait PBS-Tween 0.1% contenant l'anticorps primaire anti-CYP2U1. Après plusieurs lavages dans le PBS-Tween 0.1% (4 x 10 min) la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante en présence d'anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase dilué au 1/2000 dans du PBS-Tween. Une dernière séquence de lavage élimine l'excès d'anticorps secondaire puis la membrane est baignée dans une solution d'ECL Plus™ (Amersham Biosciences). Les protéines sont révélées par une exposition d'une minute sur un film autoradiographique qui sera ensuite développé.

VI.2.10 Préparation du métabolite majoritaire de la débrisoquine

Une incubation à grande échelle de la débrisoquine dans un volume total de 50 mL en présence de microsomes de rat traité au phénobarbital a été effectuée pendant 45 min à 37°C dans les conditions suivantes : 2 µM P450, 5mM de substrat et 1 mM de NADPH.

Les protéines ont été précipité comme précédemment. L'acétonitrile a été évaporé au rotavapeur, l'eau éliminée au lyophilisateur. Le résidu a été repris dans un minimum d'eau et une première chromatographie a été effectuée sur colonne Sepack C18 (élution par un mélange eau acétonitrile). Une seconde étape de chromatographie a permis de séparer l'hydroxydébrisoquine de la débrisoquine. Le gradient est le même que celui utilisé en CLHP-MS mais avec un débit de 2 mL.min⁻¹ sur une colonne C18 semi-préparative (colonne Agilent, Zorbax C18) avec un suivi en UV à 210 nm. Les différentes fractions contenant le métabolite principal ont été rassemblées et le produit d'hydroxylation de la débrisoquine a été caractérisé par RMN du proton.

Les spectres ont été enregistrés par un spectromètre Bruker 500MHz à une température de 300K dans D₂O. Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au signal du (Me)₄Si, les constantes de couplage sont données en Hz.

CHAPITRE VII.

ANNEXES

CYP2A6	290	NLVM	TTLN	LF	GGTE	IV	STL	RY	GFL	LL	MK	HP	EV	EAK	VHE	EID	RV	I	G	K	R	Q	P	K	F	E	D	R	A	K	M	P	Y	M	E	A	V	I	H	E	I	Q	R	F	G	D	V	I	P	M	S	L	A	R	R	V	K	K	D	T	K	F	380																												
CYP2A7	290	NLMM	STLN	LF	AGTE	IV	STL	RY	GFL	LL	MK	HP	EV	EAK	VHE	EID	RV	I	G	K	R	Q	P	K	F	E	D	R	T	K	M	P	Y	M	E	A	V	I	H	E	I	Q	R	F	G	D	V	I	P	M	S	L	A	R	R	V	K	K	D	T	K	F	380																												
CYP2A13	290	NLVM	TTLN	LF	GGTE	IV	STL	RY	GFL	LL	MK	HP	EV	EAK	VHE	EID	RV	I	G	K	R	Q	P	K	F	E	D	R	A	K	M	P	Y	M	E	A	V	I	H	E	I	Q	R	F	G	D	V	I	P	M	S	L	A	R	R	V	K	K	D	T	K	F	380																												
CYP2B6	287	NLNL	N	TL	SL	FF	AGTE	IV	STL	RY	GFL	LL	M	K	Y	P	H	A	E	R	V	Y	R	E	I	E	Q	V	I	G	R	H	R	P	P	E	L	H	D	R	A	K	M	P	Y	T	E	A	V	I	H	E	I	Q	R	F	S	D	L	L	P	M	G	V	P	H	I	V	T	Q	H	S	F	377																	
CYP2C8	286	NL	V	G	T	V	A	D	L	F	V	A	G	T	E	T	S	T	L	R	Y	G	L	L	L	L	K	H	P	E	V	T	A	K	V	Q	E	E	I	D	H	V	I	G	R	H	R	S	P	C	M	Q	D	R	S	H	M	P	Y	T	D	A	V	V	H	E	I	Q	R	Y	S	D	L	V	P	T	G	V	P	H	A	V	T	T	D	K	F	376			
CYP2C9	286	S	L	E	N	T	A	V	D	L	F	G	A	G	T	E	T	S	T	L	R	Y	A	L	L	L	L	K	H	P	E	V	T	A	K	V	Q	E	E	I	E	V	I	G	R	H	R	S	P	C	M	Q	D	R	S	H	M	P	Y	T	D	A	V	V	H	E	I	Q	R	Y	I	D	L	L	P	T	S	L	P	H	A	V	T	C	D	K	F	376			
CYP2C18	286	S	L	I	A	T	V	D	M	F	G	A	G	T	E	T	S	T	L	R	Y	G	L	L	L	L	K	H	P	E	V	T	A	K	V	Q	E	E	I	E	C	V	V	G	R	H	R	S	P	C	M	Q	D	R	S	H	M	P	Y	T	D	A	V	V	H	E	I	Q	R	Y	I	D	L	L	P	T	S	L	P	H	A	V	T	C	D	V	K	F	376		
CYP2C19	286	N	L	V	I	T	A	A	D	L	L	G	A	G	T	E	T	S	T	L	R	Y	A	L	L	L	L	K	H	P	E	V	T	A	K	V	Q	E	E	I	E	R	V	V	G	R	H	R	S	P	C	M	Q	D	R	S	H	M	P	Y	T	D	A	V	V	H	E	I	Q	R	Y	I	D	L	L	P	T	S	L	P	H	A	V	T	C	D	V	K	F	376	
CYP2D6	294	N	L	R	I	V	V	A	D	L	F	S	A	G	M	V	T	S	T	L	A	W	G	L	L	M	I	L	H	P	D	V	G	R	R	V	Q	E	I	D	D	V	I	G	Q	V	R	R	P	E	M	G	D	Q	A	H	M	P	Y	T	A	V	I	H	E	V	Q	R	F	G	D	I	V	P	L	G	V	H	M	T	S	R	D	I	E	V	384				
CYP2E1	288	G	I	V	T	V	A	D	L	F	F	A	G	T	E	T	S	T	L	R	Y	G	L	L	L	L	K	H	P	E	V	T	A	K	V	Q	E	E	I	E	B	V	I	G	R	H	R	S	P	C	M	Q	D	R	S	H	M	P	Y	T	D	A	V	V	H	E	I	Q	R	F	I	T	L	V	P	S	N	L	P	H	E	A	T	R	D	I	F	378			
CYP2F1	287	T	L	L	M	T	T	N	L	F	G	G	T	E	IV	STL	L	H	H	A	F	L	A	L	M	K	Y	P	K	V	G	A	R	V	Q	E	E	I	D	L	V	V	G	R	A	L	P	A	L	K	D	R	A	A	M	P	Y	T	D	A	V	I	H	E	V	Q	R	F	A	D	I	P	M	N	L	P	H	R	V	T	R	D	I	A	F	377					
CYP2J2	300	N	L	I	C	S	T	L	D	L	F	F	A	G	T	E	T	S	T	L	R	W	A	L	L	M	A	L	P	E	I	Q	E	K	V	G	A	E	I	D	R	V	I	G	Q	G	Q	P	S	T	A	A	R	E	S	M	P	Y	T	N	A	V	I	H	E	V	Q	R	M	G	N	I	P	L	N	V	P	R	E	V	T	V	D	I	T	L	390				
CYP2R1	299	N	L	I	F	S	V	G	E	L	I	I	A	G	T	E	T	S	T	L	R	W	A	L	F	M	A	L	P	N	I	Q	G	V	G	K	E	I	D	L	I	M	G	R	N	G	K	P	S	W	D	R	K	C	K	M	P	Y	T	E	A	V	L	H	E	V	L	R	F	C	N	I	V	P	L	G	I	F	H	A	T	S	E	A	V	V	389				
CYP2S1	291	N	M	L	M	T	V	I	Y	L	L	F	A	G	T	E	IV	STL	L	L	L	L	M	K	Y	P	H	V	G	K	W	R	E	E	L	N	R	E	L	G	A	P	S	L	D	R	T	R	L	P	Y	T	D	A	V	L	H	E	A	G	R	L	L	A	L	V	P	M	I	P	R	T	L	M	R	T	R	F	381												
CYP2U1	341	Y	L	F	I	I	G	D	L	F	I	A	G	T	E	T	S	T	L	N	S	L	L	W	L	L	M	L	N	P	D	V	G	E	K	V	H	E	I	E	R	V	I	G	A	N	A	P	S	L	D	K	A	M	P	Y	T	E	A	T	I	M	E	V	Q	R	L	T	V	V	V	P	L	A	I	P	M	T	S	E	N	I	V	L	374						
CYP2W1	285	N	A	V	A	C	T	L	D	M	V	M	A	G	T	E	T	S	T	L	Q	W	A	L	L	M	G	R	H	P	D	V	G	R	V	E	E	I	D	R	V	L	G	P	R	T	R	L	E	D	Q	A	L	P	Y	T	S	A	V	L	H	E	V	Q	R	F	I	T	L	L	P	H	-	V	P	R	C	T	A	A	D	I	Q	L	374						
CYP2A6	381	R	D	F	F	L	P	K	G	T	E	V	F	P	M	L	G	S	V	L	R	D	P	S	F	S	N	P	D	F	N	P	Q	H	F	L	N	E	K	G	Q	F	K	K	S	D	A	F	V	P	F	S	I	G	K	R	N	C	F	G	E	G	L	A	R	M	E	L	F	L	F	T	T	V	M	Q	N	F	R	L	K	S	S	--	Q	S	P	K	469		
CYP2A7	381	R	D	F	F	L	P	K	G	T	E	V	F	P	M	L	G	S	V	L	R	D	P	S	F	S	N	P	D	F	N	P	Q	H	F	L	N	E	K	G	Q	F	K	K	S	D	A	F	V	P	F	S	I	G	K	R	N	C	F	G	E	G	L	A	R	M	E	L	F	L	F	T	T	V	M	Q	N	F	R	L	K	S	S	--	Q	S	P	K	469		
CYP2A13	381	R	D	F	F	L	P	K	G	T	E	V	F	P	M	L	G	S	V	L	R	D	P	S	F	S	N	P	D	F	N	P	Q	H	F	L	N	E	K	G	Q	F	K	K	S	D	A	F	V	P	F	S	I	G	K	R	N	C	F	G	E	G	L	A	R	M	E	L	F	L	F	T	T	V	M	Q	N	F	R	L	K	S	S	--	Q	S	P	K	469		
CYP2B6	378	R	G	Y	I	P	K	D	T	E	V	F	L	I	S	T	A	L	H	D	P	H	Y	F	E	K	P	D	A	F	N	P	D	H	F	L	D	A	N	G	A	L	K	K	T	E	A	F	I	P	F	S	L	G	K	R	I	C	L	G	E	I	A	R	A	E	L	F	L	F	T	T	I	L	Q	N	F	S	M	A	S	P	--	V	A	P	E	466			
CYP2C8	377	R	N	Y	L	I	P	K	G	T	T	I	M	A	L	L	T	S	V	L	H	D	D	K	E	F	R	N	P	I	F	D	P	G	H	F	L	D	K	N	G	N	F	K	K	S	D	Y	F	M	P	F	S	A	G	K	R	I	C	A	G	E	G	L	A	R	M	E	L	F	L	T	T	I	L	Q	N	F	N	L	K	S	V	--	D	L	K	465			
CYP2C9	377	R	N	Y	L	I	P	K	G	T	T	I	L	I	S	L	T	S	V	L	H	D	D	K	E	F	R	N	P	I	F	D	P	G	H	F	L	D	K	N	G	N	F	K	K	S	D	Y	F	M	P	F	S	A	G	K	R	I	C	V	G	E	A	L	A	G	M	E	L	F	L	T	T	I	L	Q	N	F	N	L	K	S	L	--	V	D	P	K	465		
CYP2C18	377	K	N	Y	L	I	P	K	G	T	T	I	T	S	L	T	S	V	L	H	D	D	K	E	F	R	N	P	I	F	D	P	G	H	F	L	D	K	N	G	N	F	K	K	S	D	Y	F	M	P	F	S	A	G	K	R	M	C	M	G	E	G	L	A	R	M	E	L	F	L	T	T	I	L	Q	N	F	N	L	K	S	Q	--	V	D	P	K	465			
CYP2C19	377	R	N	Y	L	I	P	K	G	T	T	I	L	I	S	L	T	S	V	L	H	D	D	K	E	F	R	N	P	I	F	D	P	G	H	F	L	D	K	N	G	N	F	K	K	S	D	Y	F	M	P	F	S	A	G	K	R	I	C	V	G	E	A	L	A	G	M	E	L	F	L	T	T	I	L	Q	N	F	N	L	K	S	L	--	I	D	P	K	465		
CYP2D6	385	G	G	F	R	I	P	K	G	T	T	I	N	L	S	V	L	K	D	E	A	V	W	E	K	P	F	R	H	P	E	H	F	L	D	A	Q	G	H	V	K	P	E	A	F	L	P	S	A	G	R	R	A	C	L	G	E	P	L	A	R	M	E	L	F	L	F	T	S	L	L	O	H	F	S	F	S	V	P	--	T	G	P	473							
CYP2E1	379	R	G	Y	L	I	P	K	G	T	V	V	P	T	L	D	S	V	L	Y	O	N	Q	E	F	R	D	P	E	K	F	K	P	E	H	L	N	E	N	G	K	F	Y	S	O	Y	F	K	P	F	S	T	G	K	R	V	C	A	G	E	G	L	A	R	M	E	L	F	L	L	C	A	I	L	Q	H	F	N	L	K	P	L	--	V	D	P	K	467			
CYP2F1	378	R	G	F	L	I	P	K	G	T	D	V	I	T	L	N	L	V	H	Y	D	P	S	Q	F	L	T	P	E	F	N	P	E	H	F	L	D	A	N	Q	S	F	K	K	S	P	A	F	M	P	F	S	A	G	R	R	L	C	L	G	E	S	L	A	R	M	E	L	F	L	Y	L	T	A	I	L	C	S	F	S	L	Q	L	P	L	--	G	A	P	E	466
CYP2J2	391	A	G	Y	H	L	P	K	G	T	M	I	L	N	L	T	A	L	H	R	D	E	T	E	W	A	T	P	D	T	F	N	P	D	H	F																																																							

VII.1.2 Aligement pour Modeller

```

CYP2C5.1DT6 PPGPTPFPIIGNILQIDAKDISKS-----LTKFSECYGPVFTVYLGMPKPTVVLHGVEAVKEALVD
CYP2C8.1SUO PPGPTPL-IIGNMLQIDVKDICKS-----FTNFSKVYGPVFTVYFGMNPVVVHGYEAVKEALID
CYP2D6.2F9Q PPGPLPLP-----QNTPYC-----FDQLRRRFGDVFSLQLAWTPVVVNLGLAAVREALVT
CYP2B4.1PO5 PPGPSPLPVLGNLLQMDRKLRS-----FLRLREKYGDVFTVYLGSRVVVLCGTDIAIREALVD
CYP2A6.1Z10 PPGPTPLPFIIGNYLQLNTEQMYNS-----LMKISERYGPVFTIHLGPRRVVVLGCHDAVREALVD
CYP2R1.3CZH PPGPPGLPFIIGNIYSLAASSELPH-----VYMRKQSQVYGEI FSLDLGGISTVVLNGYDVVKECLVH
CYP2U1 PPGPTPWPLVGNFGHVLLPFLRRRSWLSRTRAAGIDPSVIGPQVLLAHLARVYGSIFSGFFIGHYLVVVLSDFHSVREALVQ

CYP2C5.1DT6 LGEEFAGRGSVPILEKV---SKGLGIAFSN-AKTWKEMRRFSLMTRLNFGMGKRSIEDRIQEEARCLVEELRKTNASPCDPTF
CYP2C8.1SUO LGEEFAGRGNPSISQRI---TKGLGIISSN-GKRWKEIRRFSLTTLRNFGMGKRSIEDRVQEEAHLVEELRKTNASPCDPTF
CYP2D6.2F9Q HGEDTADRPVPIIQILGFGPRSQGVFLARYGPAWRQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACLAFAFNHSGRPFRPNG
CYP2B4.1PO5 QAEAFSGRGKIAVVDPI---FDQYGVIFAN-GERWRALRRFSLATMRDFMGKRSVEERIQEEARCLVEELRKTNSKGLLNDNTL
CYP2A6.1Z10 QAEAFSGRGEQATFDWV---FKGYGVVFSN-GERAKQLRRFSIATLRDFGVGKRGIEERIQEEAGFLIDALRGTGGANIDPTF
CYP2R1.3CZH QSEIFADRPLPLFMKM---TKMGGLLNSRYGRGWDHRRRLAVNSFRYFGYQKSFESKILEETKFFNDAIETYKGRPFDFKQ
CYP2U1 QAEVFSRPRVPLISIV---TKEKGVVFAHYGVPVWRQQRKFSHTLRHFGLGKLSLEPKIIEEFKYVKAEMQKHGEDPFCPFS

CYP2C5.1DT6 ILGCAPCNVICSVIFHNRFDYKDEEFLKLMESLHENVELLGTP-----LDYFP-GIHKTLKNADYIKNFIMEKVKE
CYP2C8.1SUO ILGCAPCNVICSVVFKRFDYKDNFLTLMKRFNENFRILNSPWIQVCNFPLLIDCFP-GTHNKVLKNVALRSYIREKVKE
CYP2D6.2F9Q LLDKAVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLDLDAQEGLKEESGLREVLNAV-VDRHIP-ALACKVLRFAQFLTQLDELLTE
CYP2B4.1PO5 LFHSITSNICSI VFGKRFYKDPVFLRLDLFFQSFSLISSFSSQVFEFSGFLKHFPG-THRDIYRNLQENITFIGQSVEK
CYP2A6.1Z10 FLSRITVSNVSSI VFGDRFDYKDFLRLMLLGIQFTSTSTGQLYEMFSSVMKHLR-GPQQQAFOLLQGLDFIAKKVEH
CYP2R1.3CZH LITNAVSNITNLIIFGERFTYEDTDFQHMIELFSENVELAASAVFLYNAPP-WIGILPFGKHQLFRNAAVVYDFLSRLIEK
CYP2U1 IISNAVSNICSLCFGRFDYTNSEFKKMLGFMSRGLIICLNSQVLLVNICP-WLYYLPFGPFKELRQIEKDI TSFLKKIKD

CYP2C5.1DT6 HQKLLDVNN-PRDFIDCFLIKMEQE---NNLEFTLESLSVIAVSDLFGAGTETTSTTLRYSLLLLLKHPEVAARVQEEIERVI
CYP2C8.1SUO HQASLDVNN-PRDFIDCFLIKMEQE-KDNQKSEFNLENLVGTADLVFAGTETTSTTLRYGLLLLLKHPEVTAKVQEEIDHVI
CYP2D6.2F9Q HRMTWPAQPPRDLTEAFLAEMEKA-KGNPESSFNDENLRIVVADLFSAGMVTSTTLAWGLLLMLHPDVRQRRVQEEIDDDVI
CYP2B4.1PO5 HRATLDPSN-PRDFIDVYLLRMEKD-KSDRSEFHQNLILTVLSLFFAGTETTSTTLRYGFLMLKYPHVTERVQEEIEQVI
CYP2A6.1Z10 NQRTLDPSN-PRDFIDSLIRMQEE-EKNPNTEFYLNKLVMTLNLFLIGGTETVSTTLRYGFLMLMKHPEVEAKVHVEEIDRVI
CYP2R1.3CZH ASVNRKPKQL-PQHFDAYLDEMDQG-KNDPSSTFSKENLIFSVELI IAGTETTNTVLRWAILFMALYPNIQGVQKEIDLIM
CYP2U1 HQESLDREN-PQDFIDMYLLHMEERKNNSNSFDEEYLFYIIGDLFIAGTDTTNSLLWCLLYMSLNPDVQEKVHVEEIERVI

CYP2C5.1DT6 GRHRSPCMQDRSRMPYTDAVIHEIQRFIDLLPTNLPHAVTRDVRFRNYFIPKGTDIITSLTSVLHDEKAFPNPKVFDPGHFLD
CYP2C8.1SUO GRHRSPCMQDRSRMPYTDVVHEIQRYSDLVPTGVPHAVTTDKFRNYLIPKGTTIMALLTSVLHDDKEFPNPNIFDPGHFLD
CYP2D6.2F9Q QVRRPEMGDQAHPYTTAVIHEVQRFQDIPVPLGTMHTSRDIEVQGFRIIPKGTTLITNLSVVKDEAVWEKPFRRFHFPEFLD
CYP2B4.1PO5 GSHRPPALDDRAKMPYTDVAVIHEIQRLGDLIPFGVPHVTVDKQFRGYVIPKNTEVFPVLSALHDPFRYFETPNTFNPQHFLD
CYP2A6.1Z10 GKNRQPKFEDRAKMPYMEAVIHEIQRFQDVI PMSLARVVKDKTFRDFFLPKGTEVYPMLGSVLRDPSFFSNPQDFNPQHFLD
CYP2R1.3CZH GPNGKPSWDDKCKMPYTEAVLHEVLRFCNIVPLGIFHATSEDAVVRGYSIPKGTTVITNLYSVHFDKEYWRDPEVFHPPERFLD
CYP2U1 GANRAPSLTDKAQMPYTEATIMEVQRLTVVPLAIPHMTSENTVLOGYTIIPKGTLLIPNLWSVHRDPAIWEKPEDFYPNRFLD

CYP2C5.1DT6 ESGNFKKSDFYMPFSAGKRMCVGEGLARMELFLFLTSILQNFKLSLVEPKDLITAVVNGFVSVPPSYQLCFPIH
CYP2C8.1SUO KGNFKKSDFYMPFSAGKRICAGEGLARMELFLFLTTILQNFNLSVDDLKNLNTTAVIKGIVSLPPSYQICFIPV--
CYP2D6.2F9Q AQGHFVQPEAFLPFSAGRRACLGEPLARMELFLFFTSLLQHFSSVPTGQRRPSSHGVF-AFLVSPSPYELCAVPR--
CYP2B4.1PO5 ANGALKRNEGFMFSLGKRICLGEGLIARTELFLFFTTILQNFSLASPVPPEDIDLTPRESGVGNVPPSYQIRFLARH-
CYP2A6.1Z10 EKGQFKKSDAFVFPFSIGKRNCVGEGLARMELFLFFTVMQNFRLKSSQSPKIDVSPKHVGFATIPRNYTMSFLPR--
CYP2R1.3CZH SSGYFAKKEALVPSLGRRHCLGEHLARMEMFLFFALLQRFHLHFPHLV-PDLKPRL-GMTLQPPYLICAEERRH-
CYP2U1 DQQQLIKKETFIPFGIGKRVCMGEQLAKMELFLMFVSLMQSFAFALPEDSKKPLLTGREF-GLTLAPHFNFITISRR--

```

VII.2 Scripts et données bioinformatiques

VII.2.1 Script Modeller

```

from modeller import *
from modeller.automodel import *
from modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()

env.io.atom_files_directory = ['.', '../chainA-pdb']

env.io.hetatm = True

# Cree une nouvelle classe basee sur 'loopmodel' qui sera
redefinie
# select_loop_atoms
class MyLoop(dope_loopmodel):
    # Definit les residus qui seront raffines par loopmodel
    def select_loop_atoms(self):
        # Two residue ranges (both will be refined
simultaneously)
        return selection(self.residue_range('17:', '40:'))

# Build 50 models, and assess with both DOPE and GA341
a = MyLoop(
    env,
    alnfile = 'cyp2U1modif.ali',
    knowns = ('1po5', '2f9q', '1dt6', '1z10', '3czh', '1suo'),
    sequence = 'CYP2U1', assess_methods=(assess.DOPE,
assess.GA341))

a.starting_model= 1
a.ending_model  = 500

a.loop.starting_model = 1          # First loop model
a.loop.ending_model  = 30         # Last loop model

a.loop.md_level      = refine.very_slow

a.make()

# Obtenir une liste de tous les modeles de a.outputs
ok_models = filter(lambda x: x['failure'] is None, a.outputs)

# Ranger les modeles par DOPE score
key = 'DOPE score'
ok_models.sort(lambda a,b: cmp(a[key], b[key]))

# Get top model
m = ok_models[0]
print "Top model: %s (DOPE score %.3f)" % (m['name'], m[key])

```

Figure VII 2 : Script modeller utilisé pour la génération des modèles de CYP2U1.

VII.2.2 Fichiers de topologie pour l'hème et le résidu CYQ

```

....0 0 2
TOPOLOGY file for haem FeIII Oda
HEM

HEM INT 0
COOR OMIT DU BEG
... 0.50000
... 1 DMM DU M 0 0 0 0.0000 0.0000 0.0000 0.000000
... 2 DMM DU M 1 0 0 1.4490 0.0000 0.0000 0.000000
... 3 DMM DU M 2 1 0 1.5220 111.1000 0.0000 0.000000
... 19 FE FE M 16 14 12 2.1000 124.0000 180.0000 1.130000
... 20 NA NP S 19 16 14 2.0800 98.0000 90.0000 -0.503000
... 21 G1A Cc S 20 19 16 1.3800 125.4000 90.0000 0.501000
... 22 G2A Cb B 21 20 19 1.4100 109.0000 180.0000 -0.175000
... 23 G3A c3 3 22 21 20 1.5100 124.0000 180.0000 -0.139000
... 24 HMA1 hc E 23 22 21 1.0900 109.5000 60.0000 0.061000
... 25 HMA2 hc E 23 22 21 1.0900 109.5000 300.0000 0.098000
... 26 HMA3 c3 3 23 22 21 1.5400 111.0000 180.0000 -0.171000
... 27 HBA1 hc E 26 23 22 1.0900 109.5000 60.0000 0.043000
... 28 HBA2 hc E 26 23 22 1.0900 109.5000 300.0000 0.080000
... 29 GGA c B 26 23 22 1.5270 109.4000 180.0000 0.942000
... 30 Q1A o E 29 26 23 1.2600 117.2000 90.0000 -0.830000
... 31 Q2A o E 29 26 23 1.2600 117.2000 270.0000 -0.844000
... 32 G3A Cb B 22 21 20 1.4100 107.0000 0.0000 -0.001000
... 33 GMA c3 3 32 22 21 1.5100 125.0000 180.0000 -0.348000
... 34 HMA1 hc E 33 32 22 1.0900 109.5000 60.0000 0.112170
... 35 HMA2 hc E 33 32 22 1.0900 109.5000 180.0000 0.112170
... 36 HMA3 hc E 33 32 22 1.0900 109.5000 300.0000 0.112170
... 37 G4A Cc S 32 22 21 1.4100 107.0000 0.0000 0.263000
... 38 CBB Cd B 37 32 22 1.3700 127.0000 180.0000 -0.277000
... 39 HB HA E 38 37 32 1.0800 120.0000 0.0000 0.199000
... 40 CLB Cc B 38 37 32 1.3700 127.0000 180.0000 0.123000
... 41 NB NO E 40 38 37 1.3800 124.0000 0.0000 -0.557000
... 42 C2B Cb B 40 38 37 1.4100 127.0000 180.0000 0.118000
... 43 GMB c3 3 42 40 38 1.5100 125.0000 0.0000 -0.462000
... 44 HMB1 hc E 43 42 40 1.0900 109.5000 60.0000 0.137170
... 45 HMB2 hc E 43 42 40 1.0900 109.5000 180.0000 0.137170
... 46 HMB3 hc E 43 42 40 1.0900 109.5000 300.0000 0.137170
... 47 G3B Cb B 42 40 38 1.4100 107.0000 180.0000 -0.108000
... 48 CAB cf B 47 42 40 1.5100 126.0000 180.0000 -0.114000
... 49 HAB ha E 48 47 42 1.0800 120.0000 0.0000 0.160000
... 50 CBB c2 B 48 47 42 1.3300 120.0000 180.0000 -0.385000
... 51 HBB1 ha E 50 48 47 1.0800 120.0000 0.0000 0.176000
... 52 HBB2 ha E 50 48 47 1.0800 120.0000 180.0000 0.153000
... 53 G4B Cc S 47 42 40 1.4100 107.0000 0.0000 0.455000
... 54 CBB Cd B 53 47 42 1.3700 127.0000 180.0000 -0.649000
... 55 HC HA E 54 53 47 1.0800 120.0000 0.0000 0.200000
... 56 G1C Cc B 54 53 47 1.3700 130.0000 180.0000 0.501000
... 57 NC NP E 56 54 53 1.3800 124.0000 0.0000 -0.619000
... 58 G2C Cb B 56 54 53 1.4100 127.0000 180.0000 0.019000
... 59 GMC c3 3 58 56 54 1.5100 125.0000 0.0000 -0.516000
... 60 HMC1 hc E 59 58 56 1.0900 109.5000 60.0000 0.163170
... 61 HMC2 hc E 59 58 56 1.0900 109.5000 180.0000 0.163170
... 62 HMC3 hc E 59 58 56 1.0900 109.5000 300.0000 0.163170
... 63 G3C Cb B 58 56 54 1.4100 107.0000 180.0000 -0.052000
... 64 G4C cf B 63 58 56 1.5100 126.0000 180.0000 -0.121000
... 65 HAC ha E 64 63 58 1.0800 120.0000 0.0000 0.172000
... 66 CBB c2 B 64 63 58 1.3300 120.0000 180.0000 -0.432000
... 67 HBC1 ha E 66 64 63 1.0800 120.0000 0.0000 0.173000
... 68 HBC2 ha E 66 64 63 1.0800 120.0000 180.0000 0.192000
... 69 G4C Cc S 63 58 56 1.4100 107.0000 0.0000 0.294000
... 70 CBD Cd B 69 63 58 1.3700 127.0000 180.0000 -0.467000
... 71 HD HA E 70 69 63 1.0800 120.0000 0.0000 0.188000
... 72 G1D Cc B 70 69 63 1.3700 130.0000 180.0000 0.378000
... 73 ND NO E 72 70 69 1.3800 124.0000 0.0000 -0.675000
... 74 G2D Cb B 72 70 69 1.4100 127.0000 180.0000 0.166000
... 75 GMD c3 3 74 72 70 1.5100 125.0000 0.0000 -0.232000
... 76 HMD1 hc E 75 74 72 1.0900 109.5000 60.0000 0.077170
... 77 HMD2 hc E 75 74 72 1.0900 109.5000 180.0000 0.077170
... 78 HMD3 hc E 75 74 72 1.0900 109.5000 300.0000 0.077170

```

.... 0 0 2
 Topology file for beam FELII Qda
 HEM

HEM	INT	Q	COOR	OMIT	DU	BEG					
...	0.50000										
...	1	DMM	DU	M	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.000000
...	2	DMM	DU	M	1	0	0	1.4490	0.0000	0.0000	0.000000
...	3	DMM	DU	M	2	1	0	1.5220	111.1000	0.0000	0.000000
...	19	FE	FE	M	16	14	12	2.1000	124.0000	180.0000	1.130000
...	20	NA	NP	S	19	16	14	2.0800	98.0000	90.0000	-0.503000
...	21	GIA	Cc	S	20	19	16	1.3800	125.4000	90.0000	0.501000
...	22	GIA	Cb	B	21	20	19	1.4100	109.0000	180.0000	-0.175000
...	23	GIA	c3	3	22	21	20	1.5100	124.0000	180.0000	-0.139000
...	24	HBA1	hc	E	23	22	21	1.0900	109.5000	60.0000	0.061000
...	25	HBA2	hc	E	23	22	21	1.0900	109.5000	300.0000	0.098000
...	26	CBA	c3	3	23	22	21	1.5400	111.0000	180.0000	-0.171000
...	27	HBA1	hc	E	26	23	22	1.0900	109.5000	60.0000	0.043000
...	28	HBA2	hc	E	26	23	22	1.0900	109.5000	300.0000	0.080000
...	29	GGA	c	B	26	23	22	1.5270	109.4000	180.0000	0.942000
...	30	OLA	o	E	29	26	23	1.2600	117.2000	90.0000	-0.830000
...	31	OLA	o	E	29	26	23	1.2600	117.2000	270.0000	-0.844000
...	32	CBA	Cb	B	22	21	20	1.4100	107.0000	0.0000	-0.001000
...	33	GMA	c3	3	32	22	21	1.5100	125.0000	180.0000	-0.348000
...	34	HMA1	hc	E	33	32	22	1.0900	109.5000	60.0000	0.112170
...	35	HMA2	hc	E	33	32	22	1.0900	109.5000	180.0000	0.112170
...	36	HMA3	hc	E	33	32	22	1.0900	109.5000	300.0000	0.112170
...	37	GAA	Cc	S	32	22	21	1.4100	107.0000	0.0000	0.263000
...	38	CBB	Cd	B	37	32	22	1.3700	127.0000	180.0000	-0.277000
...	39	HB	HA	E	38	37	32	1.0800	120.0000	0.0000	0.199000
...	40	GLB	Cc	B	38	37	32	1.3700	127.0000	180.0000	0.123000
...	41	NB	NO	E	40	38	37	1.3800	124.0000	0.0000	-0.557000
...	42	GBB	Cb	B	40	38	37	1.4100	127.0000	180.0000	0.118000
...	43	GMB	c3	3	42	40	38	1.5100	125.0000	0.0000	-0.462000
...	44	HMB1	hc	E	43	42	40	1.0900	109.5000	60.0000	0.137170
...	45	HMB2	hc	E	43	42	40	1.0900	109.5000	180.0000	0.137170
...	46	HMB3	hc	E	43	42	40	1.0900	109.5000	300.0000	0.137170
...	47	CBB	Cb	B	42	40	38	1.4100	107.0000	180.0000	-0.108000
...	48	CAB	cf	B	47	42	40	1.5100	126.0000	180.0000	-0.114000
...	49	HAB	ha	E	48	47	42	1.0800	120.0000	0.0000	0.160000
...	50	GBB	c2	B	48	47	42	1.3300	120.0000	180.0000	-0.385000
...	51	HBB1	ha	E	50	48	47	1.0800	120.0000	0.0000	0.176000
...	52	HBB2	ha	E	50	48	47	1.0800	120.0000	180.0000	0.153000
...	53	GAB	Cc	S	47	42	40	1.4100	107.0000	0.0000	0.455000
...	54	CBC	Cd	B	53	47	42	1.3700	127.0000	180.0000	-0.649000
...	55	HC	HA	E	54	53	47	1.0800	120.0000	0.0000	0.200000
...	56	GLC	Cc	B	54	53	47	1.3700	130.0000	180.0000	0.501000
...	57	NC	NP	E	56	54	53	1.3800	124.0000	0.0000	-0.619000
...	58	GBB	Cb	B	56	54	53	1.4100	127.0000	180.0000	0.019000
...	59	GMC	c3	3	58	56	54	1.5100	125.0000	0.0000	-0.516000
...	60	HMC1	hc	E	59	58	56	1.0900	109.5000	60.0000	0.163170
...	61	HMC2	hc	E	59	58	56	1.0900	109.5000	180.0000	0.163170
...	62	HMC3	hc	E	59	58	56	1.0900	109.5000	300.0000	0.163170
...	63	CBC	Cb	B	58	56	54	1.4100	107.0000	180.0000	-0.052000
...	64	CAC	cf	B	63	58	56	1.5100	126.0000	180.0000	-0.121000
...	65	HAC	ha	E	64	63	58	1.0800	120.0000	0.0000	0.172000
...	66	GBB	c2	B	64	63	58	1.3300	120.0000	180.0000	-0.432000
...	67	HBB1	ha	E	66	64	63	1.0800	120.0000	0.0000	0.173000
...	68	HBB2	ha	E	66	64	63	1.0800	120.0000	180.0000	0.192000
...	69	GAC	Cc	S	63	58	56	1.4100	107.0000	0.0000	0.294000
...	70	CBD	Cd	B	69	63	58	1.3700	127.0000	180.0000	-0.467000
...	71	HD	HA	E	70	69	63	1.0800	120.0000	0.0000	0.188000
...	72	GLD	Cc	B	70	69	63	1.3700	130.0000	180.0000	0.378000
...	73	ND	NO	E	72	70	69	1.3800	124.0000	0.0000	-0.675000
...	74	GBD	Cb	B	72	70	69	1.4100	127.0000	180.0000	0.166000
...	75	GMD	c3	3	74	72	70	1.5100	125.0000	0.0000	-0.232000
...	76	HMD1	hc	E	75	74	72	1.0900	109.5000	60.0000	0.077170
...	77	HMD2	hc	E	75	74	72	1.0900	109.5000	180.0000	0.077170
...	78	HMD3	hc	E	75	74	72	1.0900	109.5000	300.0000	0.077170

VII.3 Un système procaryote adapté aux études structurales, la bactérie *Escherichia coli*

VII.3.1 Modifications du gène du CYP2U1

La production de P450s d'eucaryotes membranaires dans un hôte procaryote nécessite des modifications de la séquence nucléique.

L'ADNc du CYP2U1 a été modifié dans sa partie N-terminale (Wu, Qiao et al. 2009) avec d'une part la troncature du domaine transmembranaire et son remplacement par une séquence consensus pour l'expression de cytochromes P450 composée de résidus polaires. D'autre part, certains codons « sauvages » ont été optimisés afin d'améliorer l'expression en système bactérien (voir Figure VII-1 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Enfin, un tag histidine est ajouté en bout de séquence C-terminale pour de futures purifications sur colonne de Nickel.

CYP2U1-construction-coli	1	-----	MAKKTSSKGS	PPGTP	17
CYP2U1-sauvage	1	MSSPGPSQPPAEDPPWPARL L RAPLGLLRLLDPSGGALL L CGLVALLGWSWLRRRRRARG I PPGTP			65
CYP2U1-construction-coli	18	WPLVGNFGHVLLPPF L	RRRSWLSSR	RAAG I DPSV I GPQVLLAHLAR V YGS I F SFF I GHYL	78
CYP2U1-sauvage	66	WPLVGNFGHVLLPPF L RRRSWLSSRTRAAG I DPSV I GPQVLLAHLAR V YGS I F SFF I GHYL			126

Figure VII-1 : Séquences protéiques N-terminales du CYP2U1 humain « sauvage » et de CYP2U1 modifié exprimé dans *E. coli*. En rouge : Résidus rajoutés pour l'expression, en vert : résidus pour lesquels les codons ont été optimisés.

VII.3.2 Un isoforme sensible

Les étapes de transformation, de précultures et de casse des cellules sont détaillées en partie VI.2.3.3 p.167.

Exprimé dans les conditions habituellement utilisées (Barnes 1996; Wester, Stout et al. 2002) pour cette famille de protéine, **seule une espèce présentant un maximum d'absorption à 420 nm** en spectroscopie différentielle est produite.

Une optimisation des conditions de culture a donc été effectuée en faisant varier plusieurs paramètres : température de culture, temps d'induction, oxygénation des milieux, nature de la protéine chaperonne, concentration en inducteur, milieu de culture.

L'obtention de CYP2U1 sous une forme active avec une bande à 450 nm est alors possible dans les conditions de cultures suivantes :

1. Un milieu de culture TB enrichi en glycérol (4%) auquel est additionné de l'acide 5-aminolevulinique (0.5 mM - précurseur de l'hème), de l'hème (20 μ M) un cocktail de sels d'ions métalliques ;
2. La co-expression des chaperonne et co-chaperonne Gro-ES et Gro-EL, médiée par le plasmide d'expression pGro7 (Nishihara, Kanemori et al. 1998) ;
3. Une production à basse température (27°C) pendant seulement 24h dans erlenmeyer sous agitation (200 tours.min⁻¹) ;
4. Une induction avec une très faible concentration en IPTG (10 μ M) est aussi nécessaire afin d'obtenir l'espèce active absorbant à 450 nm.

Les taux d'expression de CYP2U1 obtenus dans *E. coli* sont bien supérieurs à ceux observés dans la levure : la protéine est produite à 170 ± 10 nmoles.L⁻¹ de culture alors que ce taux est plus de 20 fois inférieur lorsque l'expression est effectuée dans la levure (voir Tableau III-1)

Toutefois, malgré les efforts d'optimisation entrepris, la protéine obtenue présente deux bandes d'absorption à 420 et 450 nm sous forme Fe^{II}CO. L'amélioration des conditions d'expression est donc à poursuivre dans le but de ne produire que l'espèce active de la protéine. On notera néanmoins que lorsque le CYP2U1 est co-exprimé avec la P450 réductase humaine, les préparations de CYP2U1 ainsi obtenues présentent **les mêmes activités enzymatiques que celles observée avec des microsomes de levure surexprimant le CYP2U1** (détaillées dans le chapitre IV). La protéine produite est donc active.

VII.3.3 Caractérisation du CYP2U1 exprimée dans *E. coli*

A l'image de la caractérisation du CYP2U1 exprimé dans la levure, la protéine a été caractérisée par une méthode spectroscopique (spectre Fe^{II}CO) et par identification Western Blot.

Les spectres d'absorption différentiels Fe^{II}CO obtenus pour ces extraits présentent deux pics, l'un à 420 nm et l'autre à 450 nm (voir supra).

Une seconde caractérisation du CYP2U1 passe par la reconnaissance de l'enzyme via un Western Blot visible sur la Figure III-2 à la page 101. La protéine tronquée exprimée dans la bactérie est attendue à 55 kDa et une bande est bien observée pour cette taille de protéine. La caractérisation est confirmée par l'absence de protéine à ce poids moléculaire pour la bactérie n'ayant pas intégrée le plasmide (visible sur la Figure III-2). L'expression du CYP2U1 est donc confirmée pour les extraits de cultures bactériennes.

VII.4 Gradients CLHP

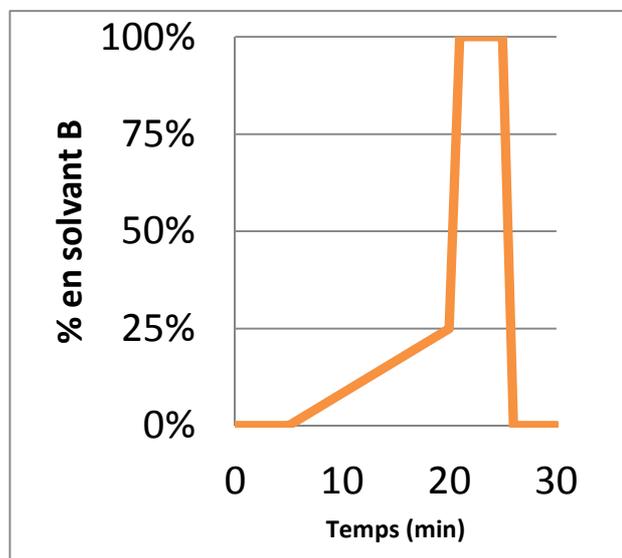
VII.4.1 Analogues de terfénadone

Colonne

Gemini C18 100x2.00mm x 3µm

Phase Mobile

Débit 200µL/min
 Solvant A AcONH₄ 10mM pH4.6
 Solvant B CH₃CN/MeOH/H₂O
 7/2/1



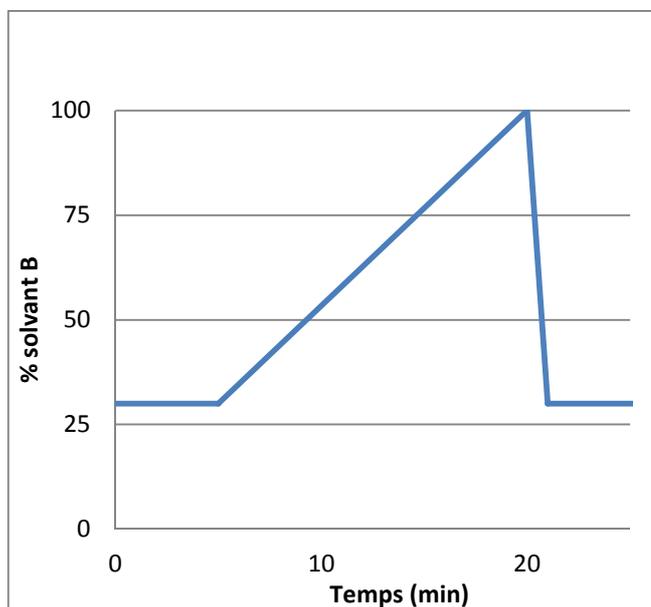
VII.4.2 Débrisoquine et ses analogues

Colonne

Gemini C18 100x2.00mm x 3µm

Phase Mobile

Débit 200µL/min
 Solvant A AcONH₄ 10mM pH4.6
 Solvant B CH₃CN/MeOH/H₂O



VII.4.3 Autres molécules testées

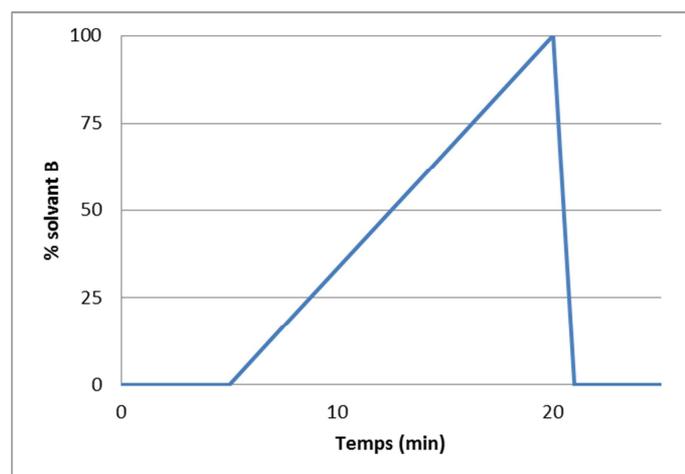
Le gradient présenté est celui utilisé par défaut pour l'analyse des incubations en présence de CYP2U1. Celui-ci est parfois modifié lorsque les molécules testées sont très polaires afin de retarder leur élution.

Colonne

Gemini C18 100x2.00mm x 3 μ m

Phase Mobile

Débit 200 μ L/min
Solvant A AcONH₄ 10mM pH4.6
Solvant B CH₃CN/MeOH/H₂O
7/2/1



CHAPITRE VIII.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, R., B. A. Hug, et al. (2011). "Effect of Ketoconazole on the Pharmacokinetics of Oral Bosutinib in Healthy Subjects." J Clin Pharmacol **51**(12): 1721-1727.
- Abrams, W. B., R. Pocelinko, et al. (1964). "Clinical Pharmacological Studies with Debrisoquin Sulfate, a New Antihypertensive Agent." J New Drugs **38**: 268-283.
- Agarwal, V., R. P. Kommaddi, et al. (2008). "Drug metabolism in human brain: high levels of cytochrome P450A43 in brain and metabolism of anti-anxiety drug alprazolam to its active metabolite." PLoS One **3**(6): e2337.
- Aigrain, L., D. Pompon, et al. (2009). "Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase." EMBOR **10**(7): 742-747.
- Al-Anizy, M., N. J. Horley, et al. (2006). "Cytochrome P450 Cyp4x1 is a major P450 protein in mouse brain." Febs **273**(5): 936-947.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.
- Andersson, T., J. O. Miners, et al. (1993). "Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating omeprazole metabolism." Br J Clin Pharmacol **36**(6): 521-530.
- Annalora, A. J., D. B. Goodin, et al. (2010). "Crystal structure of CYP24A1, a mitochondrial cytochrome P450 involved in vitamin D metabolism." J Mol Biol **396**(2): 441-451.
- Axelrod, J. (1955). "The enzymatic demethylation of ephedrine." J Pharmacol Exp Ther **114**(4): 430-438.
- Baker, D. and A. Sali (2001). "Protein structure prediction and structural genomics." Science **294**(5540): 93-96.
- Barnes, H. J. (1996). "Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in Escherichia coli." Methods Enzymol **272**: 3-14.
- Bayburt, T. H. and S. G. Sligar (2002). "Single-molecule height measurements on microsomal cytochrome P450 in nanometer-scale phospholipid bilayer disks." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6725-6730.
- Bellamine, A., Y. Wang, et al. (2003). "Characterization of the CYP4A11 gene, a second CYP4A gene in humans." Arch Biochem Biophys **409**(1): 221-227.
- Berka, K., E. Anzenbacherova, et al. (2012). "Binding of quinidine radically increases the stability and decreases the flexibility of the cytochrome P450 2D6 active site." J Inorg Biochem **110**: 46-50.
- Berka, K., T. Hendrychova, et al. (2011). "Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome P450 2C9 active site." J Phys Chem A **115**(41): 11248-11255.
- Bhamre, S., H. K. Anandatheerthavarada, et al. (1992). "Microsomal cytochrome P450 in human brain regions." Biochem Pharmacol **44**(6): 1223-1225.
- Bosch, H. S., A. Dinklage, et al. (2010). "Physics Programme for Initial Operation of Wendelstein 7-X." Contrib Plasma Physics **50**(8): 687-694.
- Bowie, J. U., R. Luthy, et al. (1991). "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure." Science **253**(5016): 164-170.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brodie, B. B., J. Axelrod, et al. (1955). "Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes." Science **121**(3147): 603-604.
- Brooks, B. R., C. L. Brooks, 3rd, et al. (2009). "CHARMM: the biomolecular simulation program." J Comput Chem **30**(10): 1545-1614.
- Brown, L. R. and K. Wuthrich (1977). "NMR and ESR studies of the interactions of cytochrome c with mixed cardiolipin-phosphatidylcholine vesicles." Biochim Biophys Acta **468**(3): 389-410.
- Bylund, J., J. Ericsson, et al. (1998). "Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic and linoleic acids by liquid chromatography mass spectrometry with ion trap MS2." Analytical Biochem **265**(1): 55-68.
- Bylund, J., C. Zhang, et al. (2002). "Identification of a novel cytochrome P450, CYP4X1, with unique localization specific to the brain." Biochem Biophys Res Commun **296**(3): 677-684.
- Cali, J., M. Sobol, et al. (2005). "Screen for cytochrome P450 activity using luminescent assay." Cell Notes(13): 8-10.
- Case, D. A., T. A. Darden, et al. (2010). Amber 11. San Francisco, University of California.
- Cheng, J. B., D. L. Motola, et al. (2003). "De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase." J Biol Chem **278**(39): 38084-38093.
- Chiang, C. W., H. C. Yeh, et al. (2006). "Crystal structure of the human prostacyclin synthase." J Mol Biol **364**(3): 266-274.
- Christakos, S., D. V. Ajibade, et al. (2010). "Vitamin D: metabolism." Endocrinol Metab Clin North Am **39**(2): 243-253, table of contents.
- Chuang, S. S., C. Helvig, et al. (2004). "CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids." J Biol Chem **279**(8): 6305-6314.
- Claude, A. (1943). "The Constitution of Protoplasm." Science **97**(2525): 451-456.
- Clement, B., Schultze-Mosgau, M. H., Wohlers, H. (1994). "Cytochrome P450 dependent N-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide" Biochem Pharmacol **46**(12): 2249-67
- Cojocaru, V., K. Balali-Mood, et al. (2011). "Structure and dynamics of the membrane-bound cytochrome P450 2C9." Plos Comput Biol **7**(8): e1002152.
- Cojocaru, V., P. J. Winn, et al. (2007). "The ins and outs of cytochrome P450s." Bioch Biophys Acta **1770**(3): 390-401.
- Cole, C., J. D. Barber, et al. (2008). "The Jpred 3 secondary structure prediction server." Nucleic Acids Res **36**: W197-W201.
- Colovos, C. and T. O. Yeates (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions." Protein Science **2**(9): 1511-1519.
- Connolly, M. L. (1983). "Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic-Acids." Science **221**(4612): 709-713.

- Conti, A. and M. H. Bickel (1977). "History of Drug-Metabolism - Discoveries of Major Pathways in 19th-Century." Drug Metab Rev **6**(1): 1-50.
- Conti, M., J. P. Harwood, et al. (1977). "Effect of gonadotropin-induced receptor regulation on biological responses of isolated rat luteal cells." J Biol Chem **252**(24): 8869-8874.
- Cooper, D. Y., S. Levin, et al. (1965). "Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase Systems." Science **147**(3656): 400-402.
- Cosme, J. and E. F. Johnson (2000). "Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding." J Biol Chem **275**(4): 2545-2553.
- Cui, X., D. R. Nelson, et al. (2000). "A novel human cytochrome P450 4F isoform (CYP4F11): cDNA cloning, expression, and genomic structural characterization." Genomics **68**(2): 161-166.
- de Groot, M. J., N. P. Vermeulen, et al. (1996). "A three-dimensional protein model for human cytochrome P450 2D6 based on the crystal structures of P450 101, P450 102, and P450 108." Chem Res Toxicol **9**(7): 1079-1091.
- De Lemos-Chiarandini, C., A. B. Frey, et al. (1987). "Determination of the membrane topology of the phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4 using site-specific antibodies." J cell Biol **104**(2): 209-219.
- Dessaigues, V. (1845). C. R. Acad. Sci. **21**: 1224.
- Devore, N. M., K. M. Meneely, et al. (2011). "Structural comparison of cytochromes P450 2A6, 2A13, and 2E1 with pilocarpine." Febs.
- DeVore, N. M. and E. E. Scott (2012). "Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001." Nature **482**(7383): 116-119.
- DeVore, N. M., B. D. Smith, et al. (2008). "Key residues controlling phenacetin metabolism by human cytochrome P450 2A enzymes." Drug Metab Dispos **36**(12): 2582-2590.
- Devos, A., C. L. Lino Cardenas, et al. (2010). "Genetic polymorphism of CYP2U1, a cytochrome P450 involved in fatty acids hydroxylation." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **83**(2): 105-110.
- Ding, S., B. G. Lake, et al. (1995). "Expression and alternative splicing of the cytochrome P-450 CYP2A7." Biochem J **306** (Pt 1): 161-166.
- Domanski, T. L., C. Finta, et al. (2001). "cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450." Mol Pharmacol **59**(2): 386-392.
- Dutheil, F., P. Beaune, et al. (2008). "Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain." Biochimie **90**(3): 426-436.
- Dutheil, F., S. Dauchy, et al. (2009). "Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function." Drug Metab Dispos **37**(7): 1528-1538.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Res **32**(5): 1792-1797.

- Eiermann, B., P. O. Edlund, et al. (1998). "1- and 3-hydroxylations, in addition to 4-hydroxylation, of debrisoquine are catalyzed by cytochrome P450 2D6 in humans." Drug Metab Dispos **26**(11): 1096-1101.
- Ekroos, M. and T. Sjogren (2006). "Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13682-13687.
- Ellis, S. W., G. P. Hayhurst, et al. (2000). "Evidence that serine 304 is not a key ligand-binding residue in the active site of cytochrome P450 2D6." Biochem J **345**: 565-571.
- Eramian, D., M. Y. Shen, et al. (2006). "A composite score for predicting errors in protein structure models." Protein Science **15**(7): 1653-1666.
- Estabrook, R. W., D. Y. Cooper, et al. (1963). "The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition of the Steroid C21-Hydroxylase System of the Adrenal Cortex." Biochem Z **338**: 741-755.
- Estabrook, R. W., J. I. Mason, et al. (1991). "The heterologous expression of the cytochromes P450: a new approach for the study of enzyme activities and regulation." Adv Enzyme Regul **31**: 365-383.
- Eswar, N., B. Webb, et al. (2006). "Comparative protein structure modeling using Modeller." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 5**: Unit 5 6.
- Facciola, G., M. Hidestrand, et al. (2001). "Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes." Eur J Clin Pharmacol **56**(12): 881-888.
- Fang, X., Y. Kobayashi, et al. (1997). "Stoichiometry of 7-ethoxycoumarin metabolism by cytochrome P450 2B1 wild-type and five active-site mutants." Febs Let **416**(1): 77-80.
- Fer, M., Y. Dreano, et al. (2008). "Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450." Arch Biochem Biophys **471**(2): 116-125.
- Fishelovitch, D., S. Shaik, et al. (2009). "Theoretical characterization of substrate access/exit channels in the human cytochrome P450 3A4 enzyme: involvement of phenylalanine residues in the gating mechanism." J Phys Chem B **113**(39): 13018-13025.
- Fisher, C. W., D. L. Caudle, et al. (1992). "High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in Escherichia coli." FASEB J **6**(2): 759-764.
- Fuhr, U., A. Jetter, et al. (2007). "Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the "cocktail" approach." Clin Pharm Ther **81**(2): 270-283.
- Fukami, T., M. Nakajima, et al. (2006). "CYP2A7 polymorphic alleles confound the genotyping of CYP2A6*4A allele." Pharmacogenomics J **6**(6): 401-412.
- Gajendrarao, P., N. Krishnamoorthy, et al. (2010). "Molecular modeling study on orphan human protein CYP4A22 for identification of potential ligand binding site." J Mol Graph Model **28**(6): 524-532.
- Garfinkel, D. (1958). "Studies on Pig Liver Microsomes .1. Enzymic and Pigment Composition of Different Microsomal Fractions." Arch Biochem Biophys **77**(2): 493-509.
- Gay, S. C., M. B. Shah, et al. (2010). "Crystal Structure of a Cytochrome P450 2B6 Genetic Variant in Complex with the Inhibitor 4-(4-Chlorophenyl)imidazole at 2.0-angstrom Resolution." Mol Pharmacol **77**(4): 529-538.

- Ghosh, D., J. Griswold, et al. (2009). "Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase." Nature **457**(7226): 219-223.
- Gideon, D. A., R. Kumari, et al. (2012). "What is the Functional Role of N-terminal Transmembrane Helices in the Metabolism Mediated by Liver Microsomal Cytochrome P450 and its Reductase?" Cell Biochem Biophys.
- Gomez, A., J. Nekvindova, et al. (2010). "Colorectal cancer-specific cytochrome P450 2W1: intracellular localization, glycosylation, and catalytic activity." Molecular pharmacology **78**(6): 1004-1011.
- Goodsell, D. S., G. M. Morris, et al. (1996). "Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock." J Mol Recognit **9**(1): 1-5.
- Gotoh, O. (1992). "Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences." J Biol Chem **267**(1): 83-90.
- Graham, S. E. and J. A. Peterson (1999). "How similar are P450s and what can their differences teach us?" Arch Biochem Biophys **369**(1): 24-29.
- Granvil, C. P., K. W. Krausz, et al. (2002). "4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine." J Pharmacol Exp Ther **301**(3): 1025-1032.
- Groves, J. T. and G. A. McClusky (1976). "Aliphatic Hydroxylation Via Oxygen Rebound - Oxygen-Transfer Catalyzed by Iron." Journal of the American Chemical Society **98**(3): 859-861.
- Guengerich, F. P. (2005). Human Cytochrome P450 Enzymes. Cytochrome P450 : Structure, Mechanism and Biochemistry. P. R. Ortiz de Montellano. New York, Kuwer Academic/Plenum. **3ème édition**: 377-530.
- Guengerich, F. P. and W. W. Johnson (1997). "Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems." Biochemistry **36**(48): 14741-14750.
- Guengerich, F. P., M. V. Martin, et al. (2009). "Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase." Nat Protoc **4**(9): 1245-1251.
- Guengerich, F. P., Z. Tang, et al. (2011). "Approaches to deorphanization of human and microbial cytochrome P450 enzymes." Biochimica Et Biophysica Acta **1814**(1): 139-145.
- Guengerich, F. P., Z. L. Wu, et al. (2005). "Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 465-469.
- Hannemann, F., A. Bichet, et al. (2007). "Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains." Biochim Biophys Acta **1770**(3): 330-344.
- Hashizume, T., S. Imaoka, et al. (2002). "Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes." J Pharmacol Exp Ther **300**(1): 298-304.
- Hayano, M., M. C. Lindberg, et al. (1955). "On the mechanism of the c-11beta-hydroxylation of steroids; a study with H₂O¹⁸ and O¹⁸." Arch Biochem Biophys **59**(2): 529-532.
- Headlam, M. J., M. C. Wilce, et al. (2003). "The F-G loop region of cytochrome P450_{scc} (CYP11A1) interacts with the phospholipid membrane." Biochimica Et Biophysica Acta **1617**(1-2): 96-108.
- Hiratsuka, M., H. Nozawa, et al. (2006). "Genetic polymorphisms and haplotype structures of the CYP4A22 gene in a Japanese population." Mutat Res **599**(1-2): 98-104.

- Hiroi, T., T. Chow, et al. (2002). "Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human." Drug Metab Dispos **30**(9): 970-976.
- His, W. (1887). "On the metabolic products of pyridine." Arch. Ex. Pathol. Pharmacol. **22**: 253-260.
- Hooft, R. W., G. Vriend, et al. (1996). "Errors in protein structures." Nature **381**(6580): 272.
- Howard, P. C., T. Aoyama, et al. (1990). "The metabolism of 1-nitropyrene by human cytochromes P450." Carcinogenesis **11**(9): 1539-1542.
- Hubbell, W. L., C. Altenbach, et al. (2003). "Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking." Adv Protein Chem **63**: 243-290.
- Huey, R., G. M. Morris, et al. (2007). "A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation." J Comput Chem **28**(6): 1145-1152.
- Inaba, T., S. V. Otton, et al. (1980). "Deficient metabolism of debrisoquine and sparteine." Clinical Pharmacology & Therapeutics **27**(4): 547-549.
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). "The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research." Toxicol Appl Pharmacol **207**(2 Suppl): 52-56.
- Ingelman-Sundberg, M., J. Blanck, et al. (1983). "Reduction of cytochrome P-450 LM2 by NADPH in reconstituted phospholipid vesicles is dependent on membrane charge." Eur J Biochem **134**(1): 157-162.
- Ingelman-Sundberg, M., T. Haaparanta, et al. (1981). "Membrane charge as effector of cytochrome P-450LM2 catalyzed reactions in reconstituted liposomes." Biochemistry **20**(14): 4100-4106.
- Jiang, W. and D. Ghosh (2012). "Motion and flexibility in human cytochrome p450 aromatase." PLoS One **7**(2): e32565.
- Jones, D. T. (1999). "Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices." J Mol Biol **292**(2): 195-202.
- Karlgren, M., M. Backlund, et al. (2004). "Characterization and tissue distribution of a novel human cytochrome P450-CYP2U1." Biochem Biophys Res Commun **315**(3): 679-685.
- Karlgren, M., A. Gomez, et al. (2006). "Tumor-specific expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1." Biochem Biophys Res Commun **341**(2): 451-458.
- Karlgren, M., S. Miura, et al. (2005). "Novel extrahepatic cytochrome P450s." Toxicol Appl Pharmacol **207**(2 Suppl): 57-61.
- Katagiri, M., B. N. Ganguli, et al. (1968). "A Soluble Cytochrome P-450 Functional in Methylene Hydroxylation." J Biol Chem **243**(12): 3543-&.
- Keller, W. (1842). "M. Keller on the Conversion of Benzoic into Hippuric Acid." Prov Med J Retrospect Med Sci **4**(92): 256-257.
- Kinsolving, C. R. and N. L. Munro (1975). "The objective and timing of drug disposition studies, appendix V. A comparison of the bioavailability of three dosage forms of terfenadine." Drug Metabolism Rev **4**(2): 285-290.
- Kleywegt, G. J. and T. A. Jones (1994). "Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures." Acta crystallographica Section D, Biological crystallography **50**(Pt 2): 178-185.

- Klingenberg, M. (1958). "Pigments of rat liver microsomes." *Arch Biochem Biophys* **75**(2): 376-386.
- Koch, W., P. Hoppmann, et al. (2006). "Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population." *Eur Heart J* **27**(21): 2524-2529.
- Konagurthu, A. S., J. C. Whisstock, et al. (2006). "MUSTANG: a multiple structural alignment algorithm." *Proteins-Structure Function and Genetics* **64**(3): 559-574.
- Kostrzewska, A., T. Pali, et al. (2000). "Membrane location of spin-labeled cytochrome c determined by paramagnetic relaxation agents." *Biochemistry* **39**(20): 6066-6074.
- Kremers, P., P. Beaune, et al. (1981). "Cytochrome P-450 monooxygenase activities in human and rat liver microsomes." *Eur J Biochem* **118**(3): 599-606.
- Krynetski, E. Y., V. L. Drutsa, et al. (1995). "High yield expression of functionally active human liver CYP2D6 in yeast cells." *Pharmacogenetics* **5**(2): 103-109.
- Kumar, S. (2011). "Comparative modeling and molecular docking of orphan human CYP4V2 protein with fatty acid substrates: Insights into substrate specificity." *Bioinformation* **7**(7): 360-365.
- Kumarakulasingham, M., P. H. Rooney, et al. (2005). "Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis." *Clinical Cancer Research* **11**(10): 3758-3765.
- Lafite, P. (2007). Etude du cytochrome P450 2J2 humain : Recherche de substrats et d'inhibiteurs sélectifs ; Détermination de la topologie du site actif. Paris, Université Paris Descartes. **PhD**: 283.
- Lafite, P., F. Andre, et al. (2007). "Unusual regioselectivity and active site topology of human cytochrome P450 2J2." *Biochemistry* **46**(36): 10237-10247.
- Lafite, P., S. Dijols, et al. (2006). "Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**(10): 2777-2780.
- Lahde, M., H. Raunio, et al. (1993). "Expression of human placental cytochrome P450 aromatase (CYP19) cDNA in insect cells using a luciferase based baculovirus vector." *Biochem Biophys Res Commun* **197**(3): 1511-1517.
- Lake, B. G. (1999). "Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment." *Food Chem Toxicol* **37**(4): 423-453.
- Lamb, D. C., L. Lei, et al. (2009). "The first virally encoded cytochrome p450." *J Virol* **83**(16): 8266-8269.
- Lanz, M., R. Theurillat, et al. (1997). "Characterization of stereoselectivity and genetic polymorphism of the debrisoquine hydroxylation in man via analysis of urinary debrisoquine and 4-hydroxydebrisoquine by capillary electrophoresis." *Electrophoresis* **18**(10): 1875-1881.
- Laskowski, R. A., M. W. Macarthur, et al. (1993). "Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures." *Journal of Applied Crystallography* **26**: 283-291.
- Lee, B. and F. M. Richards (1971). "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility." *J Mol Biol* **55**(3): 379-400.
- Lee, C. A., D. Neul, et al. (2010). "Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2." *Drug Metab Dispos* **38**(2): 347-356.
- Li, A., X. Jiao, et al. (2004). "Biotti crystalline corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2." *American journal of human genetics* **74**(5): 817-826.

- Li, W., Y. Tang, et al. (2009). "Molecular modeling of human cytochrome P450 2W1 and its interactions with substrates." Journal of molecular graphics & modelling **28**(2): 170-176.
- Li, W., Y. Tang, et al. (2008). "Probing ligand binding modes of human cytochrome P450 2J2 by homology modeling, molecular dynamics simulation, and flexible molecular docking." Proteins-Structure Function and Genetics **71**(2): 938-949.
- Li, X. C., J. Baudry, et al. (2004). "Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(9): 2939-2944.
- Li, Y. C., C. W. Chiang, et al. (2008). "Structures of prostacyclin synthase and its complexes with substrate analog and inhibitor reveal a ligand-specific heme conformation change." J Biol Chem **283**(5): 2917-2926.
- Lightfoot, T., S. W. Ellis, et al. (2000). "Regioselective hydroxylation of debrisoquine by cytochrome P4502D6: implications for active site modelling." Xenobiotica **30**(3): 219-233.
- Ling, J., K. A. Johnson, et al. (2006). "Metabolism and excretion of erlotinib, a small molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in healthy male volunteers." Drug Metab Dispos **34**(3): 420-426.
- Lino Cardenas, C. L., N. Renault, et al. (2011). "Genetic polymorphism of CYP4A11 and CYP4A22 genes and in silico insights from comparative 3D modelling in a French population." Gene **487**(1): 10-20.
- Lobanov, M., N. S. Bogatyreva, et al. (2008). "[Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure]." Mol Biol (Mosk) **42**(4): 701-706.
- Lomize, M. A., I. D. Pogozheva, et al. (2012). "OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D370-376.
- Ludemann, S. K., V. Lounnas, et al. (2000). "How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms." J Mol Biol **303**(5): 797-811.
- Lundbeck, H. (2002). Summary of product characteristics. Ebixa (memantine hydrochloride). Valby, Denmark, H. Lundbeck, A/S: 1-13.
- Luria, M. H. and E. D. Freis (1965). "Treatment of Hypertension with Debrisoquin Sulfate (Declinax)." Curr Ther Res Clin Exp **7**: 289-296.
- Mackay, D. S. and S. Halford (2011). "Focus on Molecules: Cytochrome P450 family 4, subfamily V, polypeptide 2 (CYP4V2)." Exp Eye Res.
- Malcolm, S. L. and T. R. Marten (1976). "Determination of debrisoquin and its 4-hydroxy metabolite in plasma by gas chromatography/mass spectrometry." Anal Chem **48**(6): 807-809.
- Mandell, D. J., E. A. Coutsias, et al. (2009). "Sub-angstrom accuracy in protein loop reconstruction by robotics-inspired conformational sampling." Nature Methods **6**(8): 551-552.
- Mansuy, D. (1998). "The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol **121**(1-3): 5-14.
- Mansuy, D. and P. Battioni (2000). Diversity of reactions catalysed by heme-thiolate proteins. Biochemistry and binding : activation of small molecules. K. Kadish, Smith, K., Guilard, R., Eds. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers. **4**: 1-15.

- Mansuy, D., P. Battioni, et al. (1989). "Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases." Eur J Biochem **184**(2): 267-285.
- Mast, N., W. L. Liao, et al. (2009). "Combined use of mass spectrometry and heterologous expression for identification of membrane-interacting peptides in cytochrome P450 46A1 and NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase." Arch Biochem Biophys **483**(1): 81-89.
- Mast, N., M. A. White, et al. (2008). "Crystal structures of substrate-bound and substrate-free cytochrome P450 46A1, the principal cholesterol hydroxylase in the brain." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(28): 9546-9551.
- McGuffin, L. J., K. Bryson, et al. (2000). "The PSIPRED protein structure prediction server." Bioinformatics **16**(4): 404-405.
- Mikus, G., A. A. Somogyi, et al. (1991). "Thebaine O-demethylation to oripavine: genetic differences between two rat strains." Xenobiotica **21**(11): 1501-1509.
- Morris, G. M., R. Huey, et al. (2009). "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." J Comput Chem **30**(16): 2785-2791.
- Mortimer, O., K. Persson, et al. (1990). "Polymorphic formation of morphine from codeine in poor and extensive metabolizers of dextromethorphan: relationship to the presence of immunoidentified cytochrome P-450IID1." Clin Pharmacol Ther **47**(1): 27-35.
- Mueller, G. C. and J. A. Miller (1949). "The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver; the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for triphosphopyridine nucleotide." J Biol Chem **180**(3): 1125-1136.
- Munro, A. W., D. G. Leys, et al. (2002). "P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome." Trends in biochemical sciences **27**(5): 250-257.
- Murray, G. I., S. Patimalla, et al. (2010). "Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer." Histopathology **57**(2): 202-211.
- Nakano, M., E. J. Kelly, et al. (2009). "Expression and characterization of CYP4V2 as a fatty acid omega-hydroxylase." Drug Metabol Dis **37**(11): 2119-2122.
- Nakayama, T., K. Arai, et al. (1967). "16-alpha-hydroxylation of dehydroepiandrosterone by human fetal tissues." Endocrinol Jpn **14**(3): 269-275.
- Nelson, D. R. (1998). "Cytochrome P450 nomenclature." Methods Mol Biol **107**: 15-24.
- Nelson, D. R., D. C. Zeldin, et al. (2004). "Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants." Pharmacogenetics **14**(1): 1-18.
- Nguyen, T. A., M. Tychopoulos, et al. (2008). "Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo." Mol Pharmacol **73**(4): 1122-1133.
- Nilsson, T., I. V. Ivanov, et al. (2010). "LC-MS/MS analysis of epoxyalcohols and epoxides of arachidonic acid and their oxygenation by recombinant CYP4F8 and CYP4F22." Arch Biochem Biophys **494**(1): 64-71.
- Nishihara, K., M. Kanemori, et al. (1998). "Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in Escherichia coli." Appl Environ Microbiol **64**(5): 1694-1699.

- Nyberg, S. L., H. J. Mann, et al. (1996). "Extrahepatic metabolism of 4-methylumbelliferone and lidocaine in the anhepatic rabbit." Drug Metab Dispos **24**(6): 643-648.
- Oakley, S., L. S. Vedula, et al. (2012). "Recognition of anesthetic barbiturates by a protein binding site: a high resolution structural analysis." PLoS One **7**(2): e32070.
- Oda, A., N. Yamaotsu, et al. (2005). "New AMBER force field parameters of heme iron for cytochrome P450s determined by quantum chemical calculations of simplified models." J Comput Chem **26**(8): 818-826.
- Ohta, Y., S. Kawato, et al. (1992). "Dynamic structures of adrenocortical cytochrome P-450 in proteoliposomes and microsomes: protein rotation study." Biochemistry **31**(50): 12680-12687.
- Olesen, O. V. and K. Linnet (1997). "Hydroxylation and demethylation of the tricyclic antidepressant nortriptyline by cDNA-expressed human cytochrome P-450 isozymes." Drug Metab Dispos **25**(6): 740-744.
- Omura, T. and A. Ito (1991). "Biosynthesis and intracellular sorting of mitochondrial forms of cytochrome P450." Methods Enzymol **206**: 75-81.
- Omura, T. and R. Sato (1962). "A New Cytochrome in Liver Microsomes." J Biol Chem **237**(4): 1375-&.
- Omura, T. and R. Sato (1962). "A new cytochrome in liver microsomes." J Biol Chem **237**: 1375-1376.
- Ortiz de Montellano, P. R., Ed. (2005). Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Otyepka, M., J. Skopalik, et al. (2007). "What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date?" Biochimica Et Biophysica Acta **1770**(3): 376-389.
- Ozalp, C., E. Szczesna-Skorupa, et al. (2006). "Identification of membrane-contacting loops of the catalytic domain of cytochrome P450 2C2 by tryptophan fluorescence scanning." Biochemistry **45**(14): 4629-4637.
- Paine, M. J., L. A. McLaughlin, et al. (2003). "Residues glutamate 216 and aspartate 301 are key determinants of substrate specificity and product regioselectivity in cytochrome P450 2D6." J Biol Chem **278**(6): 4021-4027.
- Palade, G. E. and P. Siekevitz (1956). "Liver microsomes; an integrated morphological and biochemical study." J Biophys Biochem Cytol **2**(2): 171-200.
- Pan, Y., B. A. Abd-Rashid, et al. (2011). "Heterologous expression of human cytochromes P450 2D6 and CYP3A4 in Escherichia coli and their functional characterization." Protein Journal **30**(8): 581-591.
- Patten, C. J., H. Ishizaki, et al. (1992). "Catalytic properties of the human cytochrome P450 2E1 produced by cDNA expression in mammalian cells." Arch Biochem Biophys **299**(1): 163-171.
- Paulson, S. K. and H. F. DeLuca (1985). "Subcellular location and properties of rat renal 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase." J Biol Chem **260**(21): 11488-11492.
- Pearce, R., D. Greenway, et al. (1992). "Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation." Arch Biochem Biophys **298**(1): 211-225.

- Petrek, M., P. Kosinova, et al. (2007). "MOLE: a Voronoi diagram-based explorer of molecular channels, pores, and tunnels." Structure **15**(11): 1357-1363.
- Petrek, M., M. Otyepka, et al. (2006). "CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities." BMC Bioinformatics **7**: 316.
- Peyronneau, M. A., J. P. Renaud, et al. (1992). "Optimization of Yeast-Expressed Human Liver Cytochrome-P450 3a4 Catalytic Activities by Coexpressing NADPH-Cytochrome-P450 Reductase and Cytochrome-B5." European Journal of Biochemistry **207**(1): 109-116.
- Peyronneau, M. A., J. P. Renaud, et al. (1992). "Optimization of yeast-expressed human liver cytochrome P450 3A4 catalytic activities by coexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b5." Eur J Biochem **207**(1): 109-116.
- Phillips, J. C., R. Braun, et al. (2005). "Scalable molecular dynamics with NAMD." J Comput Chem **26**(16): 1781-1802.
- Pikuleva, I. A., N. Mast, et al. (2008). "Studies of membrane topology of mitochondrial cholesterol hydroxylases CYPs 27A1 and 11A1." Lipids **43**(12): 1127-1132.
- Pontius, J., J. Richelle, et al. (1996). "Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures." J Mol Biol **264**(1): 121-136.
- Porubsky, P. R., K. P. Battaile, et al. (2010). "Human cytochrome P450 2E1 structures with fatty acid analogs reveal a previously unobserved binding mode." J Biol Chem **285**(29): 22282-22290.
- Porubsky, P. R., K. M. Meneely, et al. (2008). "Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates." J Biol Chem **283**(48): 33698-33707.
- Poulos, C. K. and E. F. Johnson, Eds. (2005). Structures of cytochromes P450 enzymes. In Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry. New York.
- Poulos, T. L. (2003). "Cytochrome P450 flexibility." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13121-13122.
- Poulos, T. L., B. C. Finzel, et al. (1985). "The 2.6-A crystal structure of Pseudomonas putida cytochrome P-450." J Biol Chem **260**(30): 16122-16130.
- Poulos, T. L., B. C. Finzel, et al. (1987). "High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam." J Mol Biol **195**(3): 687-700.
- Poulos, T. L., B. C. Finzel, et al. (1987). "High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam." J Mol Biol **195**(3): 687-700.
- Rat, E., I. Billaut-Laden, et al. (2006). "Evidence for a functional genetic polymorphism of the human retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1, an enzyme that may be involved in spina bifida." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **76**(6): 491-498.
- Reilly, C. A. and G. S. Yost (2006). "Metabolism of capsaicinoids by P450 enzymes: a review of recent findings on reaction mechanisms, bio-activation, and detoxification processes." Drug Metabolism Rev **38**(4): 685-706.
- Ring, B. J., J. S. Gillespie, et al. (2002). "Identification of the human cytochromes P450 responsible for atomoxetine metabolism." Drug Metab Dispos **30**(3): 319-323.
- Rittle, J. and M. T. Green (2010). "Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics." Science **330**(6006): 933-937.

- Rivera, S. P., S. T. Saarikoski, et al. (2002). "Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450." Mol Pharmacol **61**(2): 255-259.
- Roberts, A. G., M. J. Cheesman, et al. (2010). "Intramolecular heme ligation of the cytochrome P450 2C9 R108H mutant demonstrates pronounced conformational flexibility of the B-C loop region: implications for substrate binding." Biochemistry **49**(40): 8700-8708.
- Roberts, G. A., G. Grogan, et al. (2002). "Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp." J Bacteriol **184**(14): 3898-3908.
- Roche, O., R. Kiyama, et al. (2001). "Ligand-protein database: linking protein-ligand complex structures to binding data." J Med Chem **44**(22): 3592-3598.
- Rodriguez-Pazos, L., M. Ginarte, et al. (2011). "Analysis of TGM1, ALOX12B, ALOXE3, NIPAL4 and CYP4F22 in autosomal recessive congenital ichthyosis from Galicia (NW Spain): evidence of founder effects." Br J Dermatol **165**(4): 906-911.
- Roselli, C. E., M. Liu, et al. (2009). "Brain aromatization: classic roles and new perspectives." Semin Reprod Med **27**(3): 207-217.
- Rowland, P., F. E. Blaney, et al. (2006). "Crystal structure of human cytochrome P450 2D6." J Biol Chem **281**(11): 7614-7622.
- Roy, A., A. Kucukural, et al. (2010). "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction." Nat Protoc **5**(4): 725-738.
- Rylander, T., E. P. Neve, et al. (2001). "Identification and tissue distribution of the novel human cytochrome P450 2S1 (CYP2S1)." Biochem Biophys Res Com **281**(2): 529-535.
- Sanchez-Ponce, R. and F. P. Guengerich (2007). "Untargeted analysis of mass spectrometry data for elucidation of metabolites and function of enzymes." Anal Chem **79**(9): 3355-3362.
- Sansen, S., M. H. Hsu, et al. (2007). "Structural insight into the altered substrate specificity of human cytochrome P450 2A6 mutants." Arch Biochem Biophys **464**(2): 197-206.
- Sansen, S., J. K. Yano, et al. (2007). "Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2." J Biol Chem **282**(19): 14348-14355.
- Sansom, M. S. P. and P. C. Biggin (2010). Molecular Simulations and Biomembranes: From Biophysics to Function, Royal Society of Chemistry.
- Sasame, H. A., M. M. Ames, et al. (1977). "Cytochrome P-450 and NADPH cytochrome c reductase in rat brain: formation of catechols and reactive catechol metabolites." Biochem Biophys Res Commun **78**(3): 919-926.
- Schenkman, J. B. and I. Jansson (1999). "Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5." Drug Metabolism Rev **31**(2): 351-364.
- Schenkman, J. B., S. G. Sligar, et al. (1981). "Substrate interaction with cytochrome P-450." Pharmacol Ther **12**(1): 43-71.
- Schmiedeberg, O. M., H. (1879). "On the metabolic product after feeding camphor." Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **3**: 442.
- Schoch, G. A., J. K. Yano, et al. (2008). "Determinants of cytochrome P450 2C8 substrate binding: structures of complexes with montelukast, troglitazone, felodipine, and 9-cis-retinoic acid." J Biol Chem **283**(25): 17227-17237.

- Schoch, G. A., J. K. Yano, et al. (2004). "Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site." J Biol Chem **279**(10): 9497-9503.
- Sevrioukova, I. F. and T. L. Poulos (2010). "Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18422-18427.
- Shank-Retzlaff, M. L., G. M. Raner, et al. (1998). "Membrane topology of cytochrome P450 2B4 in Langmuir-Blodgett monolayers." Arch Biochem Biophys **359**(1): 82-88.
- Sigrist, C. J., L. Cerutti, et al. (2010). "PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D161-166.
- Smith, B. D., J. L. Sanders, et al. (2007). "Structure of the human lung cytochrome P450 2A13." J Biol Chem **282**(23): 17306-17313.
- Smith, G., C. R. Wolf, et al. (2003). "Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases." Lancet **361**(9366): 1336-1343.
- Sobierajski, R., S. Bruijn, et al. (2011). "Damage mechanisms of MoN/SiN multilayer optics for next-generation pulsed XUV light sources." Opt Express **19**(1): 193-205.
- Sridar, C., N. T. Snider, et al. (2011). "Anandamide oxidation by wild-type and polymorphically expressed CYP2B6 and CYP2D6." Drug Metab Dispos **39**(5): 782-788.
- Stark, K., M. Dostalek, et al. (2008). "Expression and purification of orphan cytochrome P450 4X1 and oxidation of anandamide." Febs J **275**(14): 3706-3717.
- Stark, K., Z. L. Wu, et al. (2008). "mRNA distribution and heterologous expression of orphan cytochrome P450 20A1." Drug Metab Dispos **36**(9): 1930-1937.
- Stern, J. O. and J. Peisach (1974). "A model compound study of the CO-adduct of cytochrome P-450." J Biol Chem **249**(23): 7495-7498.
- Stresser, D. M., M. I. Broudy, et al. (2004). "Highly selective inhibition of human CYP3Aa in vitro by azamulin and evidence that inhibition is irreversible." Drug Metab Dispos **32**(1): 105-112.
- Strushkevich, N., S. A. Usanov, et al. (2010). "Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles." J Mol Biol **397**(4): 1067-1078.
- Strushkevich, N., S. A. Usanov, et al. (2008). "Structural analysis of CYP2R1 in complex with vitamin D3." J Mol Biol **380**(1): 95-106.
- Strushkevich, N., S. A. Usanov, et al. (2008). "Structural analysis of CYP2R1 in complex with vitamin D3." J Mol Biol **380**(1): 95-106.
- Taimi, M., C. Helvig, et al. (2004). "A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid." J Biol Chem **279**(1): 77-85.
- Takaya, N., S. Suzuki, et al. (1999). "Cytochrome p450nor, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus *Fusarium oxysporum*." Arch Biochem Biophys **372**(2): 340-346.
- Tang, Z., S. G. Salamanca-Pinzon, et al. (2010). "Human cytochrome P450 4F11: heterologous expression in bacteria, purification, and characterization of catalytic function." Arch Biochem Biophys **494**(1): 86-93.
- Thomas, B. J. and R. Rothstein (1989). "Elevated Recombination Rates in Transcriptionally Active DNA." Cell **56**(4): 619-630.

- Uno, Y., K. Matsuno, et al. (2009). "Cloning, expression, and characterization of CYP3A43 cDNA in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*)." Drug Metab Lett **3**(4): 228-233.
- Urban, P., G. Truan, et al. (1993). "Xenobiotic metabolism in humanized yeast: engineered yeast cells producing human NADPH-cytochrome P-450 reductase, cytochrome b5, epoxide hydrolase and P-450s." Biochem Soc Trans **21**(4): 1028-1034.
- Ure, A. (1841). "On Hippuric Acid and Its Tests." Prov Med Surg J (1840) **2**(42): 317-318.
- van Meer, G., D. R. Voelker, et al. (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 112-124.
- Vaz, A. D., D. F. McGinnity, et al. (1998). "Epoxidation of olefins by cytochrome P450: evidence from site-specific mutagenesis for hydroperoxo-iron as an electrophilic oxidant." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3555-3560.
- Vincent-Viry, M., S. Deshayes, et al. (1988). "Hydroxylation of debrisoquine using perfused liver isolated from Sprague Dawley and DA rats: comparison with in-vivo results." J Pharm Pharmacol **40**(10): 695-700.
- von Wachenfeldt, C., T. H. Richardson, et al. (1997). "Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in *Escherichia coli* following modification of its N-terminus." Arch Biochem Biophys **339**(1): 107-114.
- Wang, A., U. Savas, et al. (2012). "Crystal structure of human cytochrome P450 2D6 with prinomastat bound." J Biol Chem.
- Wang, A., U. Savas, et al. (2011). "Structural Characterization of the Complex between alpha-Naphthoflavone and Human Cytochrome P450 1B1." J Biol Chem **286**(7): 5736-5743.
- Wang, A., U. Savas, et al. (2011). "Structural characterization of the complex between alpha-naphthoflavone and human cytochrome P450 1B1." J Biol Chem **286**(7): 5736-5743.
- Wang, C., P. Bradley, et al. (2007). "Protein-protein docking with backbone flexibility." J Mol Biol **373**(2): 503-519.
- Wang, M., D. L. Roberts, et al. (1997). "Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8411-8416.
- Warner, M., C. Kohler, et al. (1988). "Regional distribution of cytochrome P-450 in the rat brain: spectral quantitation and contribution of P-450b,e, and P-450c,d." J Neurochem **50**(4): 1057-1065.
- Watts, K. S., P. Dalal, et al. (2010). "ConfGen: a conformational search method for efficient generation of bioactive conformers." J Chem Inf Mod **50**(4): 534-546.
- Wester, M. R., E. F. Johnson, et al. (2003). "Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding." Biochemistry **42**(31): 9335-9345.
- Wester, M. R., C. D. Stout, et al. (2002). "Purification and crystallization of N-terminally truncated forms of microsomal cytochrome P450 2C5." Methods Enzymol **357**: 73-79.
- Wester, M. R., J. K. Yano, et al. (2004). "The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution." J Biol Chem **279**(34): 35630-35637.

- Wilderman, P. R., M. B. Shah, et al. (2010). "Plasticity of Cytochrome P450 2B4 as Investigated by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry and X-ray Crystallography." J Biol Chem **285**(49): 38602-38611.
- Williams, P. A., J. Cosme, et al. (2000). "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity." Molecular Cell **5**(1): 121-131.
- Williams, P. A., J. Cosme, et al. (2000). "Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features." J Inorg Biochem **81**(3): 183-190.
- Williams, P. A., J. Cosme, et al. (2004). "Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone." Science **305**(5684): 683-686.
- Williams, P. A., J. Cosme, et al. (2003). "Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin." Nature **424**(6947): 464-468.
- Williams, R. T., Ed. (1947). Detoxication Mechanisms : The Metabolism of Drugs and Allied Organic Compounds. Londres, Chapman and Hall.
- Winn, P. J., V. Cojocaru, et al. (2007). "The ins and outs of the cytochromes P450: understanding the mechanics of a key drug metabolising enzyme family." Febs J **274**: 261-261.
- Wöhler, F. (1824). Tiedemann's Z. Physiol. **1**: 142.
- Wu, S., J. Skolnick, et al. (2007). "Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations." BMC Biol **5**: 17.
- Wu, Z.-L., C. D. Sohl, et al. (2006). "Recombinant enzymes overexpressed in bacteria show broad catalytic specificity of human cytochrome P450 2W1 and limited activity of human cytochrome P450 2S1." Molecular pharmacology **69**(6): 2007-2014.
- Wu, Z. L., C. J. Bartleson, et al. (2006). "Heterologous expression, purification, and properties of human cytochrome P450 27C1." Arch Biochem Biophys **445**(1): 138-146.
- Wu, Z. L., J. Qiao, et al. (2009). "Enhanced bacterial expression of several mammalian cytochrome P450s by codon optimization and chaperone coexpression." Biotech Let **31**(10): 1589-1593.
- Xia, C., D. Hamdane, et al. (2011). "Conformational changes of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase are essential for catalysis and cofactor binding." J Biol Chem **286**(18): 16246-16260.
- Yano, J. K., M. R. Wester, et al. (2004). "The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution." J Biol Chem **279**(37): 38091-38094.
- Yano, J. K., M. R. Wester, et al. (2004). "The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution." J Biol Chem **279**(37): 38091-38094.
- Yoshioka, H., N. Kasai, et al. (2006). "Enzymatic properties of human CYP2W1 expressed in *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Com **345**(1): 169-174.
- Yu, A. and R. L. Haining (2001). "Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities?" Drug Metab Dispos **29**(11): 1514-1520.

- Yu, A. M., C. P. Granvil, et al. (2003). "The relative contribution of monoamine oxidase and cytochrome p450 isozymes to the metabolic deamination of the trace amine tryptamine." J Pharmacol Exp Ther **304**(2): 539-546.
- Yu, A. M., J. R. Idle, et al. (2003). "Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase." Pharmacogenetics **13**(6): 307-319.
- Yuan, X., T. C. Ta, et al. (2009). "Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor." PLoS One **4**(5): e5609.
- Yun, C. H., R. A. Okerholm, et al. (1993). "Oxidation of the antihistaminic drug terfenadine in human liver microsomes. Role of cytochrome P-450 3A(4) in N-dealkylation and C-hydroxylation." Drug Metab Dispos **21**(3): 403-409.
- Zawaira, A., L. Y. Ching, et al. (2011). "An expanded, unified substrate recognition site map for mammalian cytochrome P450s: analysis of molecular interactions between 15 mammalian CYP450 isoforms and 868 substrates." Curr Drug Metab **12**(7): 684-700.
- Zhao, Q., S. Modi, et al. (1999). "Crystal structure of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase at 1.93 Å resolution." Protein science **8**(2): 298-306.
- Zhao, Y., M. A. White, et al. (2006). "Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole: insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction." J Biol Chem **281**(9): 5973-5981.
- Zhen, Y., O. Slanar, et al. (2006). "3,4-Dehydrodebrisoquine, a novel debrisoquine metabolite formed from 4-hydroxydebrisoquine that affects the CYP2D6 metabolic ratio." Drug Metab Dispos **34**(9): 1563-1574.