Mécanismes de régulation de l'ATP synthase mitochondriale de S.cerevisiae par son peptide endogène IF1 et étude de l'oligomérisation d'IF1 de S.cerevisiae.

Tiona Andrianaivomananjaona

▶ **To cite this version:**

Tiona Andrianaivomananjaona. Mécanismes de régulation de l'ATP synthase mitochondriale de S.cerevisiae par son peptide endogène IF1 et étude de l'oligomérisation d'IF1 de S.cerevisiae.. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : . tel-00711657

HAL Id: tel-00711657

https://theses.hal.science/tel-00711657

Submitted on 25 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris-Sud XI

♦Faculté de Médecine Paris-Sud XI♦

THÈSE

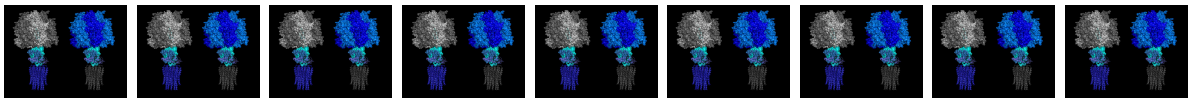
Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI
Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

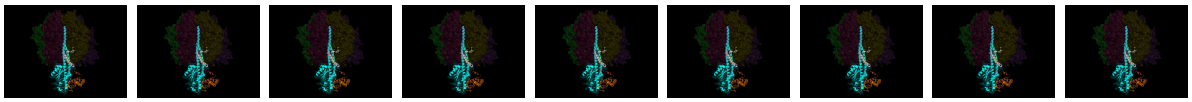
Présentée et soutenue publiquement par

Tiona ANDRIANAIVOMANANJAONA

le 7 octobre 2011



Mécanismes de régulation de l'ATP synthase mitochondriale de *S.cerevisiae* par son peptide endogène IF1 et étude de l'oligomérisation d'IF1 de *S.cerevisiae*



Membres du jury :

Président	M. Marc le Maire
Rapporteur	M. Alain Dautant
Rapporteur	M. Fabrice Rappaport
Examinateur	Mme Valérie Belle
Examinateur	Mme Marielle Valério-Lepiniec
Directeur de thèse	M. Francis Haraux

À Tiana et Norosoa,
À qui je donne tout mon amour.

Voici venu le temps où s'achèvent trois belles années de thèse... Il y aurait sans doute beaucoup à dire sur la vie scientifique et sociale qu'on mène au sein de cette petite famille scientifique du Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes (SB_2SM) car c'est inévitablement mûrie qu'on en ressort, des souvenirs plein la tête...

Avant toute chose, je voudrais remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Francis Haraux avec qui j'ai eu le grand plaisir et le privilège de travailler. Francis, merci de ta patience, de la confiance et de la liberté d'action que tu m'as données petit à petit pour faire mes premiers pas en tant que jeune scientifique. Merci de m'avoir épaulé pendant ces trois ans, et de tous tes conseils qui n'ont parfois pas été simples à me transmettre étant donné mon tempérament d'obstinée et de tête de mule, et je m'en excuse. Merci pour toutes ces discussions plus ou moins enflammées qu'on a pu avoir dans le RER ou dans le bus. Merci également pour tous ces moments de partage et de rires, toutes ces blagues et ces nombreuses anecdotes sans fin qui ravivent bien souvent l'atmosphère dans le service. Merci pour tout...

Je remercie ensuite toute l'équipe "Mécanismes et Régulation de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* devenue maintenant "Régulation des complexes mitochondriaux transducteurs d'énergie". Merci à Claire Lemaire pour ses conseils et pour ces quelques moments au cours desquels nous avons pu transformé le labo en "disco party" une fois 19h00 arrivé... Merci à Véronique pour son aide, son soutien et son écoute lors de mon début de thèse. Je remercie Gwénaëlle pour son aide précieuse, et surtout sa bonne volonté en m'ayant relayé plusieurs fois dans ces folles nuits avec nos levures de toutes sortes ! Enfin, bon courage à Qian, pour la suite de ce travail.

Je remercie également Marlène Martinho, Valérie Belle et Bruno Guigliarelli du laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des protéines (UPR 9036, CNRS, Marseille) pour avoir accepté cette collaboration, qui j'espère, sera pérenne et fructueuse. Merci pour toutes les discussions qu'on a pu partager sur IF1, car vos points de vue m'ont été bénéfiques pour l'approfondissement de la compréhension de mon système. Je n'oublie pas de souhaiter bon courage aux suivants qui prendront en main l'amélioration du taux de marquage d'IF1...

Je tiens, ensuite, à remercier affectueusement l'ensemble du troisième étage du bâtiment 532 pour tous ces moments conviviaux et intimes que nous avons passé ensemble, notamment lors de ces innombrables sessions "Rhum" ou "Liqueur" qu'Alain et Bernard nous ont si gentiment offerts. Merci aux "boiteux" pour toutes nos discussions dans le labo à boîte à gants, à Hervé pour ses partages musicaux. Et un petit clin d'oeil à Monsieur Boussac pour nous avoir tous appris à manger en dix minutes "top chrono", pour toutes nos gentilles querelles et mille excuses pour toutes les fois où je me suis incrustée dans son bureau sans raison particulière.

Je tiens à remercier Ghada Ajlani et Daniel Picot pour leur accueil chaleureux et leurs nombreux conseils. Je remercie Thanh pour toutes nos discussions sur la vie et nos partages culturels. Je remercie aussi Cédric Montigny pour ses conseils et toutes ces discussions diverses et variées. Merci à Philippe Champeil pour son regard aiguisé sur la science et sa rigueur qui m'ont apporté beaucoup. Je remercie également Bill pour son aide, sa bonne humeur, sa joie de vivre et pour m'avoir encouragé à participer à la Gordon de Bioénergétique dans laquelle j'ai pu "prendre mon pied" scientifiquement et dans laquelle j'ai pu rencontré quelques uns des plus grands noms du monde de la bioénergétique.

La liste est longue et il est naturellement impossible de citer tout le monde mais je tiens à remercier tout le service pour tous ces sourires et instants partagés qui ont rendu mon séjour à Saclay d'autant plus agréable. Ce fut une jolie rencontre.

Je n'oublie pas de remercier également toute l'équipe enseignante de l'Université d'Orsay et tout particulièrement Lisette Cohen pour m'avoir mise sur les rails des "enseignants-chercheurs". Merci pour toute la confiance qu'elle m'a donné pendant ces trois ans dans lesquelles j'ai pris un immense plaisir à enseigner.

Enfin, je remercie mes proches, mes parents et mes amis les plus chers pour leur soutien et leurs encouragements qui m'on fait chaud au cœur, particulièrement dans ces derniers mois.

Liste des abréviations

3D tridimensionnelle

% pourcent

Å Angstrom

A-CoA Acétyl-coenzyme A

ADN Acide désoxyribonucléique

ADP Adénosine diphosphate

AMP-PNP Adénylyl-imidodiphosphate

ANT Adénine nucléotide translocase

ARN Acide ribonucléique

ATP Adénosine triphosphate

BCA Acide bicinchoninique

bIF1 IF1 de *B.taurus*

BN Blue native

CD Dichroisme circulaire

CoQ Coenzyme Q

DCCD N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

DEER Double Electron Electron Resonance

DTT Dithiothréitol

FADH Flavine adénine dinucléotide réduite

FCCP Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FMN Flavine mononucléotide

GFP Green Fluoresent Protein

GTP Guanosine triphosphate

HRSEM High-Resolution Scanning Electron Microscopy

IPTG Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

ITP Inosine triphosphate

K Kelvin

LB Luria Broth

LDH Lactate déshydrogénase

mT milliTesla

MTSL 1-oxyl-2,2,5,5-tétraméthyl-δ^3-pyrroline-3-méthyl-méthanethiosulfonate

NADH Nicotinamide adénine dinucléotide réduite

nm nanomètre

NTA Acide nitrilotriacétique

OSCP Oligomycin sensitivity-conferring protein

PAGE Poly-acrylamide gel electrophoresis

PCR Polymerase chain reaction

pdb paire de base

PK Pyruvate kinase

pmf Force protomotrice

PMSF Phénylméthylsulfonyl fluoride

ROS Reactif spécifiques de l'oxygène

RPE Résonance paramagnétique électronique

SDS Sodium dodécyl sulphate

SDSL Site-Directed Spin Labeling

SMP Particules submitochondriales

TCEP Tris(2-carboxyethyl)phosphine

TFE Trifluoroéthanol

UCP Uncoupling protein

UV Ultra violet

VDAC Voltage-dependent anion channel

yIF1 IF1 de *S.cerevisiae*

μM micromètre

Sommaire

I INTRODUCTION **15**

A La Mitochondrie : centrale énergétique cellulaire . . . 18
I Structure et Fonction des mitochondries . . . 18
Structure . . . 18
Fonction . . . 18
Dysfonctionnements mitochondriaux . . . 20
Description de la chaîne respiratoire . . . 20
Description générale. . . . 20
Transfert d'électrons couplé au transfert de protons dans les quatre complexes enzymatiques. . . . 20
La production d'ATP par l'ATP synthase . . . 22
B Structure, biogenèse et organisation supramoléculaire de l'ATP synthase . . . 24
I Comparaisons de structure et nomenclature structurale de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* . . . 25
Comparaison de structure . . . 25
L'ATP synthase de *E.coli* : Structure de base. . . . 25
Comparaison des nomenclatures de *S.cerevisiae*, *B.taurus* et de *E.coli* 25
Composition des parties F_0 et F_1 de l'ATP synthase fonctionnelle de *S.cerevisiae* 28
Biogenèse de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* . . . 31
II Organisation supramoléculaire de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* . . . 32
C Mécanisme rotatif de l'ATP synthase . . . 32
I Composition du rotor et du stator . . . 33
II La translocation des protons induit le mouvement du rotor . . . 34
III Mise en évidence du mécanisme de rotation de l'ATP synthase . . . 34
D Mécanisme catalytique de l'ATP synthase . . . 35
I Le modèle de changement d'affinité établi par Paul Boyer . . . 35
II Les différents régimes catalytiques . . . 36
III Le rôle des sites non catalytiques . . . 37
E Mécanisme de régulation de l'ATP synthase mitochondriale . . . 37
I Inhibiteurs et sites de fixation dans les ATP synthases mitochondriales . . . 37
II L'inhibition de l'ATPase mitochondriale par le peptide endogène IF1 . . . 38
Description de l'IF1 de *B.taurus* . . . 39
Spécificité d'action d'IF1 pour les ATP synthases mitochondriales . . . 40
Mécanisme d'inhibition du peptide . . . 40
F Présentation du travail de thèse . . . 41

II MATÉRIELS ET METHODES **42**
G MODIFICATION ET PRODUCTION D'IF1 . . . 43
I Les outils . . . 43
Les souches de bactéries *E.coli* utilisées . . . 43
Le vecteur d'expression pET/inh1 . . . 43
PCR de mutagenèse dirigée/Clonage . . . 44
PCR de mutagenèse. . . . 44
Clonage. . . . 44
II Description et création des différents mutants d'IF1 . . . 44
Étude de l'oligomérisation d'IF1. . . . 44
Les mutants "N-ter" d'IF1 . . . 45
III Production et purification des peptides . . . 45
Transformation des clones positifs par électroporation . . . 45
Surexpression du peptide . . . 46
Lyse cellulaire . . . 46
Purification d'IF1 sur colonne Nickel . . . 46
Les IF1 wT, tronqués et cystéiques. . . . 47
Les IF1 allongés. . . . 47
Dosage de protéines et électrophorèse SDS-PAGE . . . 48
H MODIFICATION ET EXTRACTION DE L'ATP SYNTHASE ENTIÈRE ou ISOLÉE (F_1-ATPase) . . . 48
I Les outils . . . 48
Souches de levures *S.cerevisiae* utilisées . . . 48
Les plasmides "vecteur navette" bactérie *E.coli*/levure *S.cerevisiae* . . . 49
Historique d'ATP1 et d'ATP2 au laboratoire . . . 49
II Construction des mutants de F_1-α et de F_1-β . . . 50
Les mutants d'ATP1 . . . 50
Les mutants d'ATP2 : les mutants de DELSEQD . . . 50
PCR de mutagenèse . . . 50
Transformation des levures *S.cerevisiae* . . . 50
Transformation des souches "euroscarf". . . . 50
Transformation des souches W303. . . . 50
III Préparation de mitochondries et contrôles respiratoires . . . 53
IV Préparation de SMP (particules submitochondriales) . . . 53
V Préparation de F_1 isolé . . . 54
VI Dosage de protéines . . . 54
I Études structurales et expériences fonctionnelles . . . 55
I Etude de l'oligomérisation d'IF1 par spin labeling et visualisation par spectroscopie RPE . . . 55
II Marquage des peptides et détermination du taux de marquage . . . 55
Marquage des peptides IF1 cystéiques avec le marqueur de spin MTSL . . . 55
Détermination du taux de marquage . . . 55
Spectroscopie RPE . . . 56
J Mesures de l'hydrolyse d'ATP, Cinétique d'inhibition, Étude enzyme-Substrat . . . 56
I Mesure d'hydrolyse d'ATP . . . 56
II Cinétique d'inhibition et traitement des données . . . 57

III Étude enzyme-Substrat et traitement des données 58

III RÉSULTATS **60**

1 Étude de l'oligomérisation d'IF1 par marquage de spin et visualisation par spectroscopie RPE **61**

A Description biochimique d'IF1 et mise en évidence des différentes formes d'IF1 chez *B.taurus* et *S.cerevisiae* 61

B Description structurale d'IF1 : l'IF1 de *B.taurus* 63

Description du monomère d'IF1. 63

Identification des régions impliquées dans l'oligomérisation de l'IF1 bovin. 63

Une histoire de protonation pour la dimérisation d'IF1... 63

C L'IF1 de *S.cerevisiae* 64

D L'outil : Le marquage de spin et la spectroscopie RPE 64

I Principe de la technique de marquage de spin associée à la spectroscopie RPE 64

II Application de la technique de marquage de spin à l'étude de l'oligomérisation d'IF1 66

E Les mutants cystéiques, une histoire de longue date qui se poursuit 66

I Historique des mutants cystéiques au laboratoire 66

II Justification du choix des mutants cystéiques 67

F Résultats obtenus sur les IF1 E33C et IF1 L54C 68

I Mise au point du marquage 68

II Contrôle de la structure des peptides par CD en UV lointain 69

Contrôle de la structure des IF1 cystéiques. 70

Contrôle de la structure des IF1 marqués au MTSL. 70

III Analyse des spectres RPE 71

Exemple de spectres, interprétations et définitions. 71

Spectre à bande X de l'IF1 E33C et l'IF1 L54C à 298K (température ambiante) et à 100K (basse température) 72

Spectres du MTSL libre, de l'IF1 E33C et l'IF1 L54C obtenus à 298K. 72

Spectres obtenus à 100K. 73

Comment favoriser la formation de dimères d'IF1 marqués ? 73

Variation de la concentration en IF1 E33C marqué 73

Ajout d'IF1 wT en excès sur l'échantillon d'IF1 E33C marqué. 75

G Discussion, mises au point et perspectives 76

I Les résultats préliminaires tendent-ils à favoriser la formation du dimère par l'interface T ? 76

Les expériences à 298K et à 100K 76

Le problème des dimères monomarqués 77

II Les points à améliorer 78

III Les perspectives avec les mutants prévus 78

2 Pourquoi IF1 est-il reconnu spécifiquement par les ATP synthases mitochondriales ? 79
A Introduction . . . 79
B Travail de thèse . . . 80
C Résultats . . . 82
I Effet des mutations de la sous-unité α sur l'inhibition de l'ATPase par IF1 . 82
II Effet des mutations de la sous-unité β sur l'inhibition de l'ATPase par IF1 . 83
D Discussion et Perspectives . . . 84

3 GSDESKKL, séquence spécifique des ATP synthases mitochondriales est-elle impliquée dans l'oligomérisation des ATP synthases ? 88
A La dimérisation/oligomérisation des ATP synthases de mammifères et de levure . . . 88
B Hypothèses de travail . . . 88
C Résultats . . . 89
I Inhibition de l'ATPase α-Δ(193-200) par l'IF1 wT . . . 89
II Analyse d'échantillon par BN-PAGE . . . 90
D Discussion et Perspectives . . . 92

4 Rôle de la partie N-terminale d'IF1 dans l'inhibition de l'ATP synthase 93
A Position de la partie N-terminale d'IF1 dans le complexe inhibé bovin IF1/MF1 . . . 93
I Description de la structure du complexe inhibé bovin . . . 93
II Hypothèse de travail sur le modèle *S.cerevisiae* et démarche expérimentale . . 93
B Étude cinétique avec les différents mutants d'IF1 . . . 95
I Résultats obtenus sur F_1 isolé . . . 96
Données cinétiques concernant les IF1Δ1-13 $\rightarrow$ IF1Δ1-17. . . . 96
L'instabilité de l'inhibition concernant les IF1Δ1-15 $\rightarrow$ IF1 Δ1-17 . . 96
Les propriétés inhibitrices d'IF1 F17S. . . . 97
Les peptides Fusion et PsaE-IF1. . . . 99
II Résultats obtenus sur F_1F_0-ATPase entière (SMP) . . . 99
Données cinétiques concernant les IF1Δ1-13 $\rightarrow$ IF1Δ1-17. . . . 100
Les propriétés inhibitrices d'IF1 F17S. . . . 100
Les peptides Fusion et PsaE-IF1. . . . 100
C Discussion et conclusion . . . 102
I Conséquences des modifications de la partie N-terminale sur les propriétés inhibitrices d'IF1 . . . 102
Le cas des IF1 tronqués. . . . 102
La phénylalanine F17S est-elle si importante pour l'inhibition de l'ATPase ? . . . 103
Cas des peptides Fusion et PsaE-IF1. . . . 104
II Comparaisons de données et apport de la technique . . . 105
Études similaires sur la partie N-terminale d'IF1 et discussion sur les valeurs de K_i obtenues dans la littérature . . . 105
III Modèle de présentation d'IF1 à l'ATPase . . . 106

5 Les interactions $\alpha - \gamma$ et $\beta - \gamma$ ont-elles un rôle dans l'inhibition de l'ATP synthase ? 109

A Introduction . . . 109
I Description de la structure bovine . . . 109
II Description de l'étude . . . 111
Choix des mutants. . . . 111
Description de l'étude cinétique. . . . 111
Préparation des SMP. . . . 112
B Résultats . . . 113
I Effets des modifications de la sous-unité α sur l'inhibition de l'hydrolyse d'ATP par IF1 wT sur SMP . . . 113
Modification du paramètre cinétique k_{on} . . . 113
Modification de la stabilité du complexe inhibé : effets sur K_i et $K_i.k_{on}$ . . . 113
Les mutants "Glycine". . . . 113
Les mutants de délétion. . . . 115
II Effets des modifications de la sous-unité β sur l'inhibition de l'hydrolyse d'ATP par IF1 wT sur SMP . . . 117
Effets sur la reconnaissance d'IF1 par l'ATP synthase . . . 117
Effets des modifications de β sur la stabilité du complexe inhibé . . . 117
III Effet des modifications sur l'activité enzymatique de l'ATPase . . . 117
Effets des mutations de la sous-unité α sur l'activité enzymatique. . . . 119
Effets des mutations de la sous-unité β sur l'activité enzymatique . . . 119
C Discussion et Perspectives . . . 122
L'étape de reconnaissance du peptide par l'enzyme est légèrement affectée par les modifications de la boucle α. . . . 122
La stabilité du complexe est affectée par les modifications effectuées sur la sous-unité α. . . . 122
Signification de l'activité ATPasique résiduelle. . . . 123
L'interaction α-γ dans le mécanisme d'inhibition . . . 123
Perspectives. . . . 126

IV CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 127

V Article publié 141

Table des figures

1 Ultrastructure de mitochondries révélée par HRSEM (High-Resolution Scanning Electron Microscopy) . . . 19
2 Chaîne respiratoire mitochondriale de *S.cerevisiae* . . . 21
3 Composition des parties F_0 et F_1 de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* . . . 24
4 Topologie de l'ATPase de *E.coli* . . . 25
5 Description d'un monomère de sous-unité c de *E.coli* et de son anneau . . . 29
6 Partie F_1soluble de l'ATP synthase de *B.taurus* . . . 30
7 F_1-ATPase et remplissage des sites catalytiques et non catalytiques . . . 31
8 Assemblage de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* . . . 32
9 Visualisation de dimères d'ATP synthases de levure . . . 33
10 Décomposition de l'ATP synthase bactérienne en rotor et stator . . . 33
11 Modèle de translocation des protons à travers la sous-unité a et l'anneau c . . . 34
12 Mise en évidence de la rotation de la F_1F_0-ATP synthase et cycle catalytique . . . 36
13 Sites de fixation de l'efrapeptine, de l'aurovertine et d'IF1 sur la F_1-ATPase bovine . 38
14 Structure tridimensionnelle du complexe inhibé IF1-F_1-ATPase de *B.taurus* . . . 41
15 Principe de surexpression protéique dans la souche *E.Coli* BL21(DE3) . . . 43
16 Principe de mutagenèse . . . 44
17 Description des IF1 cystéiques de *S.cerevisiae* . . . 45
18 Description des IF1 de *S.cerevisiae* modifiés en N-terminal . . . 46
19 Analyse des IF1 recombinants wT et modifés en N-terminal . . . 48
20 Description des mutants de la sous-unité α de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* . . . 51
21 Description des mutants de la sous-unité β de l'ATP synthase de *S.cerevisiae* . . . 52
22 Contrôle respiratoire . . . 56
23 Mesure d'hydrolyse d'ATP . . . 57
24 Enregistrement type de cinétique d'inhibition . . . 58

1.1 Formation des oligomères d'IF1 en fonction du pH chez *B.taurus* et *S.cerevisiae* . . . 62
1.2 Description du tétramère d'IF1 bovin . . . 65
1.3 Équation chimique de la réaction du MTSL avec le site cystéique d'une protéine . . . 66
1.4 Mesure de distance entre les résidus A44, homologues à l'histidine H39 chez *S.cerevisiae*, dans l'interface D et dans l'interface T . . . 68
1.5 Protocole de marquage d'IF1 par le MTSL . . . 69
1.6 Gel SDS-PAGE 12% montrant les IF1-E33C et IF1 L54C marqués au MTSL (20%) +/- traité avec 1 mM $CuCl_2$ ou 4 mM DTT . . . 70
1.7 Contrôle de la structure α-hélicale des IF1, cystéiques (E33C et L54C) et de l' IF1 E33C marqué au MTSL par CD far-UV . . . 71

1.8 Illustration du changement de forme spectrale d'un radical nitroxide selon son régime de mobilité. . . . 72
1.9 Spectres RPE du MTSL libre, de l'IF1 E33C et de l'IF1 L54C à 298K 74
1.10 Spectres RPE obtenus pour l'IF1 E33C et l'IF1 L54C à 100K 75
1.11 Effet de l'augmentation de la concentration en IF1 E33C marqué sur la forme des spectres à 298K 76
1.12 Expérience de compétition entre l'IF1 wT et l'IF1 E33C 77

2.1 Résidus de la sous-unité β spécifiques des ATP synthases mitochondriales et situés à moins de 6 Å d'IF1 80
2.2 Résidus de la sous-unité α spécifiques des ATP synthases mitochondriales et situés à moins de 6 Å d'IF1 81
2.3 Résultats cinétiques obtenus sur le mutant α-D-FAL-N à pH 6,5 83
2.4 Position des résidus α-Q416, β-D471 et β-A474 dans le complexe inhibé bovin 86

3.1 Alignement de séquences de la sous-unité α d'ATP synthases mitochondriales et non mitochondriales 89
3.2 Structure tridimensionnelle de la F_1ATPase de *S.cerevisiae* (pdb : **2HLD**) 90
3.3 Résultats cinétiques obtenus sur le mutant α-Δ193-200 à pH 6,5 91

4.1 Vue partielle du complexe inhibé IF1-MF1 de *B.taurus* 94
4.2 Alignement de différentes séquences d'IF1 94
4.3 Comparaison des tailles du complexe MF1-IF1 de *B.taurus* et de PsaE de *Synechocystis sp.6803* 95
4.4 Constante apparente de vitesse d'inhibition et activité hydrolytique résiduelle en fonction de la concentration des IF1 modifiés 97
4.5 Réactivation partielle de l'activité ATPasique suivant l'inhibition d'IF1 Δ1-16 98
4.6 Inhibition relative de l'activité ATPasique en fonction de la concentration en IF1 F17S sur F_1-ATPase 99
4.7 Inhibition relative de l'activité ATPasique en fonction de la concentration en IF1 F17S sur SMP 101
4.8 Comparaison des valeurs de k_{on} obtenues sur F_1 isolé et sur SMP 103
4.9 Modèle de présentation du peptide IF1 à l'ATPase 107

5.1 Comparaison des complexes F_1-ATPasiques bovins non inhibé et inhibé 110
5.2 Simulation de réduction de l'encombrement stérique sur la sous-unité α 111
5.3 Alignement de séquences des sous-unités α et β et présentation des mutants 112
5.4 Constante cinétique d'inhibition apparente en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25°C pour les mutants α-^{409}GSDLDAST^{416} 114
5.5 Rapport des vitesses V_I et V_0 en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25°C sur SMP centrifugées 116
5.6 Vitesses d'inhibition apparentes en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25°C pour les mutants DELSEQD 118
5.7 Rapport des vitesses V_I et V_0 en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25°C 118
5.8 Vitesse d'hydrolyse d'ATP normalisée en fonction de la concentration en MgATP pour les mutants d'α 120

5.9 Vitesse d'hydrolyse d'ATP en fonction de la concentration en MgATP pour les mutants de β 121
5.10 Activité ATPasique résiduelle observée après inhibition de l'ATPase par IF1 sur les mutants de α et de β 121
5.11 Les trois clés de stabilisation du complexe inhibé IF1-F_1ATPase 125

Liste des tableaux

1 Nomenclature des ATP synthases de *S.cerevisiae* et *B.taurus* et gènes associés 27
2 Quelques inhibiteurs de l'ATP synthase mitochondriale 39
3 Séquences des oligonucléotides utilisés pour les différentes mutagenèse d'IF1 47
4 Souches de levures *S.cerevisiae* 49
5 Plasmides "shuttle" levures *S.cerevisiae*/bactéries*E.coli* 49
6 Séquences des oligonucléotides utilisés pour les différentes mutagenèses d'ATP1 et d'ATP2 53
7 Transformation des levures *S.cerevisiae* euroscarf, Δ*ATP1*, Δ*ATP2* 54
8 Transformation des levures *S.cerevisiae* W303, Δ*ATP1*, Δ*ATP2* 54
9 Temps de génération des levures *S.cerevisiae* wT et mutantes 55

1.1 Constantes de disssociation K_d mesurées par centrifugation analytique à différents pH pour l'IF1 de *S.cerevisiae* 61

2.1 Mutations sur β 81
2.2 Mutations sur α 82
2.3 Données cinétiques de fixation et de dissociation d'IF1 à pH 6,5 sur SMP 84

3.1 Valeurs récapitulatives des paramètres cinétiques k_{on}, K_dk_{on}, K_d 90

4.1 Paramètres cinétiques obtenus sur l'ATPase isolée (F_1-ATPase) après inhibition de l'activité hydrolytique par IF1 et ses dérivés 100
4.2 Paramètres cinétiques obtenus sur l'ATPase entière (F_1F_0-ATPase) après inhibition de l'activité hydrolytique par IF1 et ses dérivés 101

5.1 Valeurs de k_{on} sur les mutants de α-^{409}GSDLDAST^{416} 114
5.2 Valeurs de K_i, k_{off} et activité ATPasique résiduelle pour les mutants de α-^{409}GSDLDAST^{416} à pH 6,5, 25°C 116
5.3 Valeurs de k_{on} pour les mutants de β-DELSEQD à pH 6,5, 25°C 117
5.4 Valeurs de K_i, $K_i.k_{on}$ et Activité ATPasique résiduelle pour les mutants de β-DELSEQD 119
5.5 Valeur de K_M calculée pour chaque mutant d'α. 119
5.6 Valeurs des activités résiduelles (%) observées après inhibition sur SMP non centrifugées et centrifugées 120

Première partie

INTRODUCTION

GÉNÉRALITÉS

Les cellules et les organismes vivants sont des systèmes ouverts qui échangent de la matière et de l'énergie avec leur environnement dans un état loin de l'équilibre thermodynamique. Pour maintenir cet état hors équilibre, une organisation stricte s'impose au sein des cellules. Celle-ci se traduit par la réalisation de nombreux travaux nécessaires au fonctionnement cellulaire tels que des travaux osmotiques, mécaniques, chimiques, etc... Ces travaux sont utilisés pour les fonctions principales de la cellule tels que le transport des molécules à travers les diverses membranes cellulaires, la biosynthèse des macromolécules, la signalisation cellulaire, le fonctionnement des enzymes et bien d'autres encore. Ces diverses réactions peuvent être exergoniques, donc libérer de l'énergie, mais dans la plupart des cas, elles sont endergoniques et nécessitent d'être couplées à des réactions exergoniques. Pour cela toutes les cellules vivantes ont mis en place un système de couplage utilisant l'adénosine triphosphate ou ATP considérée comme vecteur énergétique universel. L'ATP est une petite molécule constituée d'un D-ribose auquel sont associés une base azoté, l'adénine ainsi que trois phosphates. L'association de ces trois phosphates et plus particulièrement du dernier en fait une molécule à liaison de haut potentiel hydrolytique. L'hydrolyse d'une mole d'ATP libère environ une trentaine de kilojoules. Sa concentration cellulaire est assez faible et doit être maintenue constante par la régulation de sa production et de sa dégradation. L'ATP peut être produit par différentes voies métaboliques (Glycolyse, β-oxydation des acides gras), cependant la production la plus efficient d'ATP se fait grâce à tous les systèmes transducteurs d'énergie. Dans le monde vivant, deux voies de transduction d'énergie conduisent à la formation d'ATP :

- La voie photosynthétique qui utilise l'énergie lumineuse comme source énergétique.
- La voie respiratoire qui utilise l'oxydation des nutriments apportés par l'extérieur.

Les voies de transduction d'énergie, qu'elles soient photosynthétique ou respiratoire, engagent différents complexes enzymatiques confinés au sein de membranes (photosynthétique, mitochondriale ou bactérienne) qui couplent un flux d'électrons à un transfert de protons. Dans notre cas, seule la voie de transduction d'énergie mitochondriale appelée encore chaîne respiratoire sera mentionnée et détaillée. Celle-ci utilise le haut pouvoir oxydo-réducteur de petites molécules (NADH , H^+, FADH, H^+ , A-CoA, etc...), obtenues par l'oxydation des nutriments dans les voies métaboliques (glycolyse, cycle de Krebs, β-oxydation des acides gras) pour transférer les électrons de complexe en complexe pour former l'ATP par l'**ATP synthase**. Ce transfert d'électrons est couplé à un transfert de protons dont l'accumulation au sein de l'espace intermembranaire oriente le mécanisme rotatoire de l'ATP synthase et permet ainsi la synthèse d'ATP.

Dans cette introduction de thèse, les mitochondries seront tout d'abord décrites comme centrale énergétique cellulaire, puis nous détaillerons la structure de l'ATP synthase, ce merveilleux moteur moléculaire qui catalyse la synthèse d'ATP. Enfin, avant d'aborder les résultats de thèse, nous détaillerons les voies de régulation de l'ATP synthase mitochondriale.

A La Mitochondrie : centrale énergétique cellulaire

L'étude de ces organites semi-autonomes logés dans les cellules eucaryotes débutent il y a un siècle et demi. Les premières observations de mitochondries débutent au milieu du XIX^{ième} siècle par l'observation de granules dans les cellules musculaires. A la fin du XIX^{ième} siècle, Altman mis au point la coloration de ces organites et les nomma *bioblastes* en raison de leur taille, similaire à celle des bactéries, leur hyptothétique rôle dans le métabolisme et leur autonomie génétique. C'est également en cette fin de XIX^{ième} siècle que le terme de *bioblaste* disparaît pour laisser place au terme *mitochondrie* (du grec *mitos* : fil et *chondros* : grain). Le milieu du XX^{ième} siècle marque une période révolutionnaire dans la connaissance de ces organites au niveau structural et métabolique. C'est en effet à cette période qu'on a pu localiser et mettre en évidence les différents évènements métaboliques cellulaires tels que le cycle d'acide citrique, encore appelé cycle de Krebs, la β-oxydation des acides gras ou la chaîne de transfert d'électrons nécessaires à la viabilité cellulaire. Ces découvertes marquent la naissance de l'ère moderne de l'énergétique cellulaire.

Les premières descriptions tridimensionnelles de mitochondries ont été révélées par microscopie électronique à transmission par Palade en 1950, puis par Sjostrand en 1953. L'ultrastructure des mitochondries n'était pas encore bien établie car les premières descriptions avaient été faites par extrapolation des coupes en série de mitochondries obtenues par microscopie électronique à transmission. Différents modèles de la structure interne mitochondriale ont été émis :

- Le modèle de Palade que nous utilisons dans la plupart des ouvrages comme modèle exact soutenait que les crêtes mitochondriales sont des invaginations de la membrane interne mitochondriale.
- Le modèle de Sjostrand postulait que les crêtes mitochondriales s'organisaient comme des lamelles indépendantes non connectées avec la membrane interne mitochondriale
- Enfin, le modèle contemporain "orthodoxe" semble être celui qui se rapproche de la réalité cellulaire. Des expériences en microscopie électronique à haute résolution révèlent la coexistence de crêtes tubulaires et de crêtes lamellaires dans les cellules de pancréas [1]. (Figure 1)

I Structure et Fonction des mitochondries

Structure

Les mitochondries sont de petits organites logés dans les cellules eucaryotes et mesurent 1 à 2 μM de long et 0,1 à 0,5 μM de large. Ce sont des structures pouvant adopter plusieurs formes, du bâtonnet à la sphère, selon le type cellulaire qu'elles habitent. Cependant elles possèdent toutes la même structure de base : L'intérieur de la mitochondrie ou matrice est séparé du cytosol par deux membranes : une membrane externe et une membrane interne. Celles-ci délimitent l'espace intermembranaire. Chacune de ces membranes et chacun de ces compartiments sont voués à des fonctions cellulaires bien précises.

Fonction

1. **La membrane externe**. La membrane externe a une épaisseur comprise entre 6 et 7 nm et est peu sélective aux ions et autres petites molécules. La membrane est composée de 60% de lipides et 40% de protéines. Les protéines présentes sont essentiellement des canaux anioniques de type VDAC et des porines.

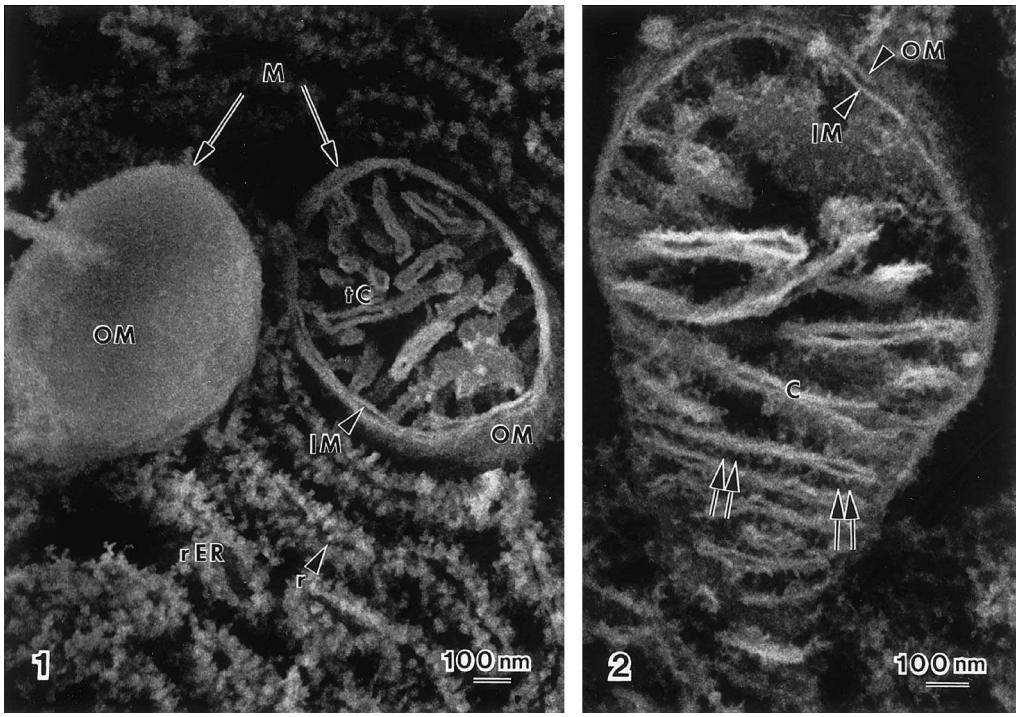


Figure 1: **Ultrastructure de mitochondries révélées par HRSEM (High-Resolution Scanning Electron Microscopy).** Zoom dans le cytosol de cellules de pancréas de rat où on visualise des mitochondries (M) à proximité du reticulum endoplasmique rugueux (rER), la membrane externe (OM), des crêtes tubulaires (tC). et lamellaires (C). (2) Les flèches pointent la présence de particules qui s'apparentent aux parties extrinsèques des ATP synthases. [1]

2. **La membrane interne**. La membrane interne est très sélective car elle est imperméable à la plupart des ions. C'est une membrane particulière caractérisée par sa richesse en protéines (80 %) et sa faible teneur en lipides (20%). Les cardiolipines sont les seuls lipides participant à l'architecture rigide de la membrane interne mitochondriale. Dans cette membrane on retrouve les constituants enzymatiques de la chaîne de transfert d'électrons décrites dans la section suivante ainsi que la protéine responsable de la production de la majorité de l'ATP cellulaire : l'ATP synthase. Elle contient également quelques protéines translocatrices d'anions comme l'ANT ou l'échangeur ADP/ATP, le transporteur de phosphate ainsi que des protéines nommées UCP (Uncoupling Protein).

   Ces deux membranes fusionnent parfois pour assurer le passage de grosses molécules ou l'import de protéines mitochondriales. Ces jonctions sont en fait des pores de translocation qui ne sont pas toujours constitutifs mais qui apparaissent lorsqu'un transport de matière est nécessaire entre le cytosol et la mitochondrie ou inversement.

3. **L'espace intermembranaire**. Il est en général très étroit (6 à 8 nm) dans les mitochondries à fortes activités respiratoires. Il contient le cytochrome c et est le lieu de l'acylation de la carnitine, étape importante dans la β-oxydation des acides-gras.

4. **L'espace matriciel**. L'espace matriciel mitochondrial est un compartiment riche et dense car il est le siège de nombreux phénomènes indispensables à la cellule. Dans la matrice sont

contenus l'ADN mitochondrial et toute la machine transcriptionnelle et traductionnelle mitochondriale. Elle est également le siège de nombreux évènements métaboliques tels que le cycle de l'acide citrique encore appelé cycle de Krebs, la β-oxydation des acides gras, la biosynthèse des vitamines, la biosynthèse des hormones stéroïdes, la biosynthèse des hèmes et le cycle de l'urée. Elle est un réservoir de calcium et le lieu de production de ROS, produits ratés de la chaîne de transfert d'électrons, ce qui fait d'elle un carrefour essentiel dans la signalisation cellulaire du calcium et des ROS. Enfin, elle est également un des acteurs majeurs dans le contrôle et l'initiation de la mort cellulaire ou apoptose.

Avec cette description succincte de ses différentes fonctions, on espère avoir convaincu le lecteur que les mitochondries sont vitales pour le fonctionnement cellulaire. Une altération de l'une de ces fonctions provoque de graves dommages à la cellule voire à l'organisme tout entier.

Dysfonctionnements mitochondriaux

Les dysfonctionnements mitochondriaux peuvent avoir diverses sources :
- Dégradation de l'ADN mitochondrial et de la machine transcriptionnelle
- Mutation dans l'ADN nucléaire codant les protéines mitochondriales
- Défauts dans les enzymes de la chaîne respiratoire et dans le fonctionnement de l'ATP synthase
- Défauts dans les enzymes participant au métabolisme
- Défauts d'assemblage dus au dysfonctionnement des protéines "chaperon"

La liste est longue et non exhaustive mais les conséquences peuvent être nombreuses. Les défauts énergétiques ou un défaut dans le contrôle de l'apoptose peuvent participer grandement à la non viabilité des cellules ou participer à la formation des tumeurs cancéreuses.

Description de la chaîne respiratoire

Dans cet exposé, le but n'étant pas de décrire l'ensemble des fonctions mitochondriales, nous allons nous recentrer sur le phénomène de respiration cellulaire et décrire plus en détail les constituants de la chaîne respiratoire et leur fonctionnement.

Description générale. Chez les eucaryotes aérobies, l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire est apportée par l'oxydation des nutriments (glucose, acides gras ou acides aminés). Ces combustibles sont dégradés en de petites molécules appelés coenzymes réduits ($NADH_2$, $FADH_2$), qui vont ensuite être oxydés en donnant leurs électrons aux différents complexes de la chaîne respiratoire, jusqu'à la réduction de l'O_2 moléculaire, accepteur final d'électrons. Ce transfert d'électrons doit être couplé au transport actif de protons qui traversent la membrane par les différents complexes. Une différence transmembranaire de potentiel électrique, $\Delta\psi$ et de pH, ΔpH est créée et l'addition de ces deux composantes constitue le gradient électrochimique, encore appelé force protomotrice (pmf). La dissipation de ce potentiel par le retour des protons dans la matrice à travers l'ATP synthase fournit une force suffisante pour catalyser la synthèse d'ATP.

Transfert d'électrons couplé au transfert de protons dans les quatre complexes enzymatiques. La structure des quatre complexes a été résolue à haute définition par radiocristallographie. Dans ce chapitre nous allons décrire cette chaîne complexe par complexe et décrire les réactions que chacun d'eux catalyse.

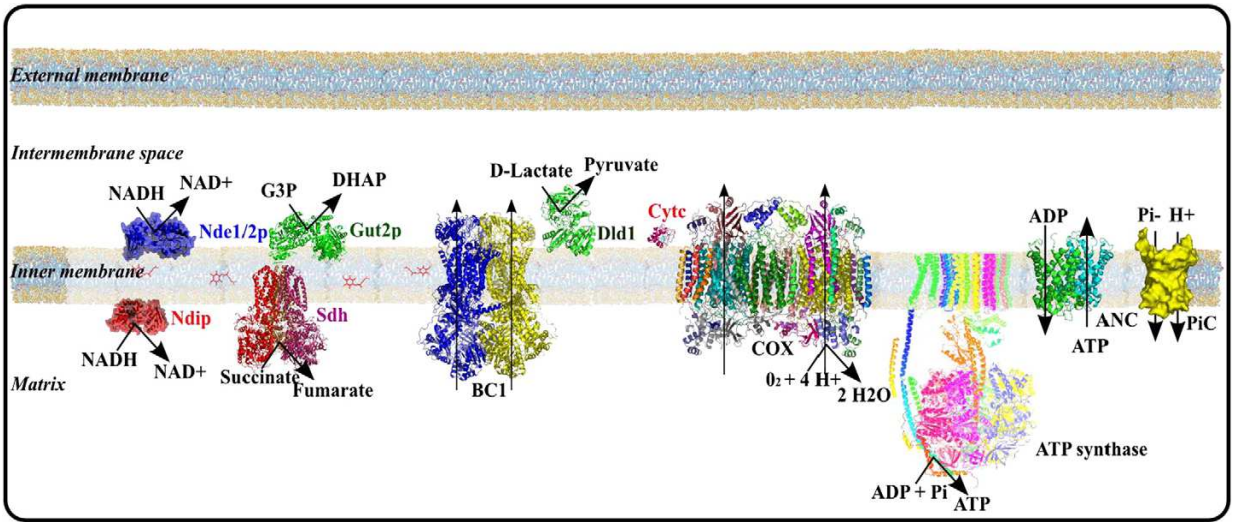


Figure 2: **Chaîne respiratoire mitochondriale de *S.cerevisiae***. Rigoulet *et al* (2010)[2]

1. **Le complexe I ou NADH UBIQUINONE OXIDO-REDUCTASE** est un large complexe composé d'une partie soluble et d'une partie transmembranaire. Sa structure 3D presque entière vient d'être résolue chez *Thermus thermophilus* par l'équipe de Sazonov en 2010[3]. C'est une enzyme qui comprend un centre FMN contenant une flavoprotéine ainsi qu'une succession de centres fer-soufre. Elle couple deux réactions :
   – La réaction exergonique de transfert de deux électrons du NADH,H^+ au pool d'ubiquinone (CoQ)
   $$NADH + H^+ + CoQ \longrightarrow NAD^+ + CoQH_2$$
   – Le transfert de 4 protons de la matrice à l'espace intermembranaire.
   Chez *S.cerevisiae*, ce complexe n'existe pas. Il est remplacé par deux NADH déshydrogénases partiellement insérées dans la membrane interne. L'une (Nde1p et Nde2p) dite externe car située du côté "espace intermembranaire", l'autre dite interne (Ndip) car située du côté matriciel. L'absence de partie transmembranaire fait qu'il n'existe par de transfert de protons lors de la réduction du NADH dans la levure.
2. **Le complexe II ou SUCCINATE DÉSHYDROGENASE** est l'unique complexe relié au fonctionnement du cycle de Krebs. C'est un complexe semi-membranaire localisé du côté matriciel. Il contient deux groupes prosthétiques, un centre ferrique lié au FAD et un centre Fe-S. Il couple l'oxydation du succinate en fumarate, produits du cycle de Krebs, à la réduction du pool d'ubiquinone.
3. **Le pool d'Ubiquinone**. L'ubiquinone (Coenzyme Q) est soluble dans les membranes et permet le transfert couplé d'électrons et de protons au sein des membranes. Elle est réduite par les deux électrons issus de l'oxydation du NADH,H^+ par le complexe I, ou par les NADH déshydrogénases de levure, et aussi par ceux issus de l'oxydation du $FADH_2$ par le complexe II. Ce pool d'ubiquinone est réoxydé lors du transfert d'électrons au complexe bc_1. Nous ne rentrerons pas dans le mécanisme cyclique de transfert d'électrons du coenzyme Q.
4. **Le complexe III ou COMPLEXE BC$_1$** est fonctionnel sous forme dimérique. Le monomère du complexe bc_1 est constitué d'un cytochrome b à 2 hèmes (b_H et b_L), de deux centres Fe-S

portés par la protéine de Rieske et d'un cytochrome c_1 à un hème (c_1). Ce complexe catalyse le transfert d'électrons au cytochrome c. La réduction de deux molécules de cytochrome c par l'ubiquinone s'accompagne de la disparition de 2 protons matriciels. Cette réaction induit le pompage de 4 protons vers l'espace intermembranaire.

$$QH_2 + 2cytc_{1oxydé} + 2H^+_{(matrice)} \longrightarrow Q + 2cytc_{1réduit} + 4H^+{}_{(intermembranaire)}$$

5. **Le cytochrome c**. Le cytochrome c est soluble et permet le transport des électrons dans l'espace intermembranaire. Il comporte un seul hème qui accepte un électron provenant du complexe III et le donne au dernier complexe de la chaîne de transfert d'électrons, la cytochrome C oxydase.
6. **Le complexe IV ou CYTOCHROME C OXYDASE**. Dernier complexe de la chaîne respiratoire, il est capable de transférer les électrons jusqu'à l'O_2 moléculaire et de transférer des protons de la matrice à l'espace intermembranaire. Le transfert d'électrons se fait à partir du cytochrome c qui donne ses électrons au centre CuA, puis les électrons sont transférés à l'hème a, à l'hème a3 - centre CuB, pour enfin être acceptés par l'oxygène moléculaire et donner une molécule d'eau. La réduction d'une molécule d'O_2 conduit au transfert de 4 protons vers l'espace intermembranaire

La production d'ATP par l'ATP synthase

Les transferts successifs d'électrons dans la membrane interne mitochondriale permettent de céder une quantité d'énergie considérable. Cette quantité d'énergie est conservée grâce au transfert de protons à travers les différents complexes. La théorie chimio-osmotique décrite par Peter Mitchell en 1961 relie cette accumulation de protons à la phosphorylation d'une molécule d'ADP et se traduit par l'addition d'un gradient chimique transmembranaire (ΔpH) et d'un gradient électrique transmembranaire ($\Delta\psi$), appelé force protomotrice (pmf). Celle-ci est utilisée pour générer le passage des protons à travers le canal à protons de l'ATP synthase qui génère alors une force mécanique suffisante pour catalyser la synthèse d'ATP, molécule universelle vectrice d'énergie.

L'ATP synthase, une merveilleuse machine protéique

B Structure, biogenèse et organisation supramoléculaire de l'ATP synthase

La compréhension du mécanisme catalytique complexe de l'ATP synthase ne peut être dissociée de cette enzyme, c'est pourquoi nous commencerons par décrire cette structure. On compte maintenant plus d'une cinquantaine de structures d'ATP synthases/ases plus ou moins partielles obtenues par microscopie électronique, Résonance magnétique nucléaire ou diffraction aux rayons X. Toutes les ATP synthases et ATPases, qu'elles soient de type F-, V-, ou A-, possèdent la même architecture globale et leur structure de base est classifiée selon la solubilité et la mobilité des différentes parties du complexe.

1. La solubilité des différentes parties du complexe (Figure 3(a)) :
   - La partie $\mathbf{F}_0$ ancre le complexe ATPasique à la membrane interne mitochondriale et assure le transfert des protons à travers la membrane.
   - La partie $\mathbf{F}_1$, soluble et tournée du côté matriciel, porte les sous-unités catalytiques de l'enzyme et le pied central de l'enzyme qui constitue une partie du rotor.
2. La mobilité des différentes parties du complexe (Figure 3(b)) :
   - La partie immobile nommé **Stator**
   - La partie mobile nommé **Rotor**

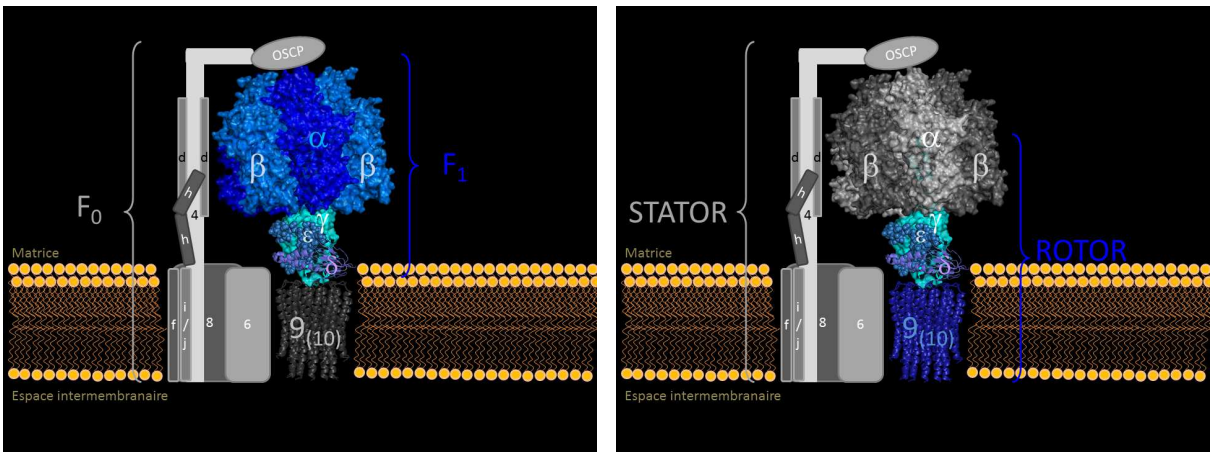


Figure 3: **Composition des parties $\mathbf{F}_0$ et $\mathbf{F}_1$ de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*.pdb** : 2WPD [4] (a) Composition de la partie F_1 et F_0 dans l'ATP synthase de *S. cerevisiae*. En bleu, les sous-unités composant la partie soluble F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$). En gris, les sous-unités composant la partie F_0 (9_{10}, 6_1, 8_1, 4_1, h_2, d_2, $OCSP_1$, f_1, i_1/j_1). (b) Composition du stator et du rotor de l'ATPase de *S.cerevisiae*. En bleu, les sous-unités composant le rotor (F_0 : 9_{10} ; F_1 : γ, δ, ε). En gris, les sous-unités composant le stator (F_0 : 6_1, 8_1, 4_1, h_2, d_2, $OCSP_1$, f_1, i_1/j_1 ; F_1 : $\alpha_3\beta_3$).

A cette date, les ATP synthases les mieux décrites d'un point de vue structural, génomique, biochimique et dont la régulation et la biogenèse sont les plus connues sont celles de *E.coli*, *S.cerevisiae* et *B.taurus*. Le modèle d'étude utilisé pendant cette thèse a été celle de la levure *S. cerevisiae*, nous essaierons donc de décrire au mieux l'ATP synthase de *S. cerevisiae*. Toutefois lorsque les données

sur *S.cerevisiae* s'avèreront être incomplètes, nous utiliserons les données obtenues sur *B.taurus* et *E.coli*.

I Comparaisons de structure et nomenclature structurale de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*

Comparaison de structure

Avant de décrire l'ATP synthase de levure, il est peut-être nécessaire de décrire la structure la plus simple de l'ATP synthase, celle de *E.coli*, et de comparer les nomenclatures des ATP synthases de *S.cerevisiae*, de *B.taurus* et de *E.coli* qui seront largement utilisées lors de cet exposé.

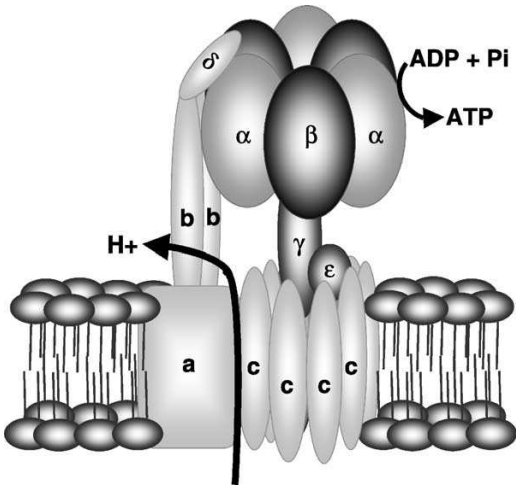


Figure 4: **Topologie de l'ATPase de *E.coli***

L'ATP synthase de *E.coli* : Structure de base. Parmi les structures d'ATP synthases connues, l'ATP synthase de *E.coli* possède sans doute la structure la plus simple. Elle est composée de 8 sous-unités différentes α, β, γ, δ, ε, a, b et c dont la stœchiométrie est la suivante : $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1 a_1 b_2 c_{10}$. La partie F_1 est composée de la tête globulaire ($\alpha_3\beta_3$) qui contient les trois sites catalytiques, et du pied central (γ, ε), et la partie F_0 est constituée d'une partie transporteur de protons (a et c_{10}), ainsi que d'un pied périphérique (b_2, δ) qui coordonne la partie membranaire avec la partie soluble.

Comparaison des nomenclatures de *S.cerevisiae*, *B.taurus* et de *E.coli* Dans les ATP synthases mitochondriales, les sous-unités qui composent les ATP synthases sont souvent plus nombreuses, la nomenclature est souvent différente selon les organismes et la comparaison entre les différentes structures peut très vite devenir fastidieuse. Nous allons à présent comparer les structures et définir les nomenclatures communes et celles qui varient bien souvent d'un organisme à l'autre. Le Tableau 1 expose les différences entre les ATP synthases de *S.cerevisiae*, *B.taurus* et *E.coli*. Dans toutes les ATP synthases la nomenclature des sous-unités catalytiques $\alpha\beta$ et du rotor $F_1\gamma$ est conservée, mais celle de toutes les autres sous-unités varie :

- Dans la partie F_1 : La sous-unité appelée δ chez *S.cerevisiae* et *B.taurus* est appelée ε chez *E.coli*. La sous-unité ε de *S.cerevisiae* et *B.taurus* n'a pas d'équivalent chez *E.coli*.

– Dans la partie F_0, nous allons distinguer les sous-unités responsables du transport de protons de celles du pied périphérique.

1. Le canal à protons : Les sous-unités **9** chez *S.cerevisiae* et chez *B.taurus* sont nommées sous-unités **c** chez *E.coli*, et la sous-unité **6** chez *S.cerevisiae* et *B.taurus* correspond à la sous-unité **a** chez *E.coli*. Enfin, la sous-unité **8** de *S.cerevisiae* correspond à la sous-unité **A6L** de *B.taurus*.
2. Le pied périphérique : La sous-unité nommée **OSCP** chez *S.cerevisiae* et *B.taurus* est homologue à la sous-unité δ chez *E.coli*. Enfin, la sous-unité **4** est équivalente à la sous-unité **b** chez *B.taurus* et *E.Coli*.

Par rapport à l'ATP synthase de *E.coli*, celle de *S.cerevisiae*, que nous allons décrire à présent, contient 5 sous-unités supplémentaires et trois protéines associées e, g et k qui sont nécessaires à la dimérisation.

	Stœchiométrie chez *S.cerevisiae*		***E.coli***	***B.taurus***	***S.cerevisiae***	**Gene**
$\mathbf{F}_1$	3	Stator	α	α	α	ATP1
	3	Stator	β	β	β	ATP2
	1	Rotor	γ	γ	γ	ATP3
	1	Rotor	ε	δ	δ	ATP16
	1	Rotor	-	ε	ε	ATP15
	-	-	δ	[OSCP]	[OSCP]	[ATP5]
$\mathbf{F}_0$	1	Stator	-	OSCP	OSCP	ATP5
	1	Stator	b	b	4	ATP4
	1	Stator	a	6	6	ATP6^{mt}
	10	Rotor	c (10)	9 (8)	9	ATP9^{mt}
	1	Stator		A6L	8	ATP8^{mt}
	1	Stator		d	d	ATP7
	1	Stator		f	f	ATP17
	1	Stator		bF6	h	ATP14
	1	Stator		-	i	ATP18
Protéines associées :						
Engagées dans la dimérisation	n.d			e	e	ATP21
	n.d			g	g	ATP20
	n.d			-	k	ATP19
Protéines régulatrices	1			IF1	IF1	INH1
	1			-	Stf1p	STF1
	n.d			-	Stf2p	STF2
	n.d			-	Stf3p	STF3

Tableau 1: **Nomenclature des ATP synthases de *E.coli*, *S.cerevisiae* et *B.taurus* et gènes associés**

Composition des parties F_0 et F_1 de l'ATP synthase fonctionnelle de *S.cerevisiae*

La partie F_0 de l'ATP synthase n'a encore jamais été résolue car la sous-unité 6 est particulièrement difficile à maintenir solidaire de l'anneau de sous-unités 9. Au contraire, l'anneau de sous-unités 9 est particulièrement stable, et a ainsi pu être résolu à haute définition avec le reste du complexe [5][4]. Chez *S.cerevisiae*, la partie F_0 est constituée de 8 sous-unités :

– **Les protéines constituant le pied périphérique** :

OSCP recouvre la couronne ($\alpha_3\beta_3$) et stabilise l'ATP synthase en permettant de relier la partie F_1 à la partie F_0.
La sous-unité 4 est le pédoncule latéral qui permet de connecter la partie F_1 de la partie F_0 via la protéine OSCP et les sous-unités stabilisant la partie F_0. Ces deux sous-unités empêche la rotation des sous-unités catalytiques pendant la rotation de la sous-unité γ.

– **Les protéines permettant la translocation des protons à travers la membrane** :

Les sous-unités 6, 8 et 9 sont des protéines codées par le génome mitochondrial.

La sous-unité 6, analogue de la sous-unité a de l'ATPase de *E.coli*. Elle véhiculerait les protons de l'espace intermembranaire à la sous-unité 9 et de la sous-unité 9 à la matrice. Les données disponibles sur la sous-unité a de *E.coli* mentionnent qu'elle serait constituée de 5 ou 6 segments transmembranaires [6][7]. Au sein de sa structure, parmi les 4 résidus indispensables à la fonction : Glu_{196}, Arg_{210}, Glu_{219} et His_{245}, seule l'arginine 210 serait strictement conservée.

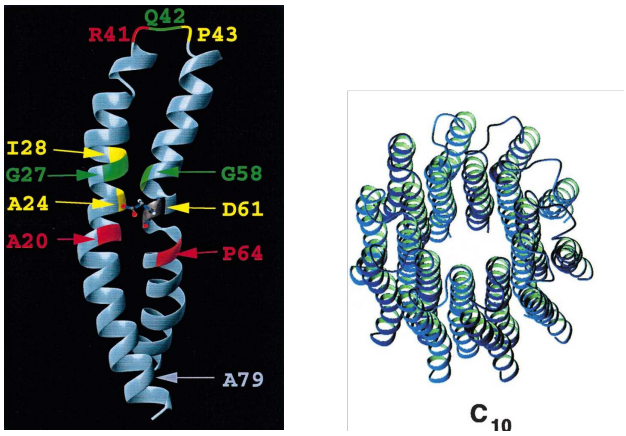
La sous-unité 9, analogue de la sous-unité c de l'ATP synthase de *E.coli*. Le monomère de sous-unités 9 est constitué de deux hélices α transmembranaires reliées entre elles par une boucle transmembranaire hydrophile. Les alignements de séquence font apparaître l'existence d'un résidu $Asp_{61 E.coli}$ très conservé (Figure 5(a)). Ce résidu peut être présent sous forme de glutamate chez d'autres organismes et joue un rôle important dans la translocation des protons. Ce mécanisme sera détaillé dans la section II. Chez *S.cerevisiae*, 10 sous-unités 9 forment l'anneau protéique (Figure 5(b)) permettant d'actionner la turbine de l'ATP synthase. L'anneau de sous-unités 9 est indispensable à la transformation de l'énergie osmotique en énergie mécanique

La sous-unité 8 est essentielle à l'assemblage du secteur F_0 [9][10]. Sa fonction n'est pas très claire jusqu'à maintenant mais le défaut d'expression de cette sous-unité rend l'assemblage de la sous-unité 6 difficile [11] et l'ATP synthase devient alors non fonctionnelle.

– **Les protéines stabilisant le secteur F_0** : les sous-unités d, f, h et i/j.

La sous-unité d est essentielle à la fonction de l'ATP synthase. Elle est hydrophile et associée aux trois sous-unités du pied périphérique (4, h et OSCP) [12].

La sous-unité f est requise pour l'assemblage des sous-unités 6, 8 et 9, codées par l'ADN mitochondrial [13].



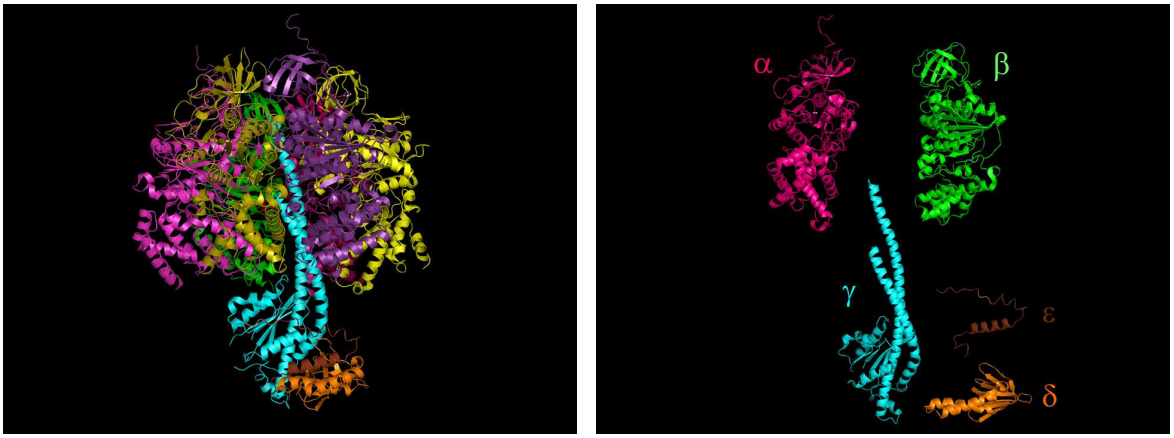
(a) (b)

Figure 5: **Description d'un monomère de sous-unité c de *E.coli* et de son anneau**[8]. (a) 2 hélices α transmembranaires avec le résidu Asp61 responsable du transport des protons dans la membrane. (b) C10 : stoechiométrie de sous-unité c présent chez *E.coli* et chez *S.cerevisiae*.

la sous-unité h est essentielle à l'assemblage et/ou à la catalyse de l'enzyme [14].
La sous-unité i/j est requise pour l'expression de la sous-unité 6 et de la sous-unité f [15]. Il est possible que cette sous-unité joue un rôle dans la dimérisation des ATP synthases [16].

La partie F_1 On pourrait dire que structuralement la partie soluble de l'ATP synthase n'a plus de secret car plusieurs structures 3D des secteurs F_1 de *E.coli*, de *B.taurus* et de *S.cerevisiae* ont été maintenant définies à haute résolution. Composée de la manière suivante : $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$, la partie F_1 se caractérise essentiellement par la présence de sa couronne catalytique $\alpha_3\beta_3$ et de ses unités rotatives $\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$ qui lui permettent un fonctionnement catalytique indépendant de la partie F_0. Bien sûr, en l'absence de gradient de protons, la partie F_1 seule ne peut assurer la synthèse d'ATP mais uniquement l'hydrolyse d'ATP (Figure 6).

1. **Les sous-unités catalytiques.**
   L'analyse des séquences des sous-unités α et β montre que les deux sous-unités présentent 25 % d'identité suggérant que ces deux protéines sont issues d'un même gène ancestral [18][19][20][21].
   Les 6 sites nucléotidiques (3 sites catalytiques et 3 sites non catalytiques) sont situés sur les interfaces catalytiques α/β mais :
   – les 3 sites non catalytiques de l'enzyme sont plutôt portés par la sous-unité α. Les résidus 159 à 164 de la sous-unité α chez *B.taurus* interagissent avec le motif triphosphate de l'ATP et appartiennent à la boucle P.
   – les 3 sites catalytiques de l'enzyme qui peuvent lier les nucléotides ADP, ATP, GTP et ITP et hydrolyser les trois derniers sont plutôt portés par la sous-unité β. Les résidus 171 à 177 font partie de la boucle P.
2. **Les sous-unités du rotor.**
   La sous-unité γ est essentielle au couplage énergétique car elle transmet l'énergie issue de la rotation de l'anneau de sous-unités 9 pour catalyser les réactions de synthèse d'ATP. Elle établit des contacts non covalents mais permanents avec cet anneau et des contacts périodiques



(a) (b)

Figure 6: **Partie F_1 soluble de l'ATP synthase de *B.taurus*** [17]. F_1-ATPase inhibée par le DCCD. (a) Structure assemblée de la F_1-ATPase. (b) Structure dissociée de la F_1-ATPase. Une seule sous-unité α (α_{TP}) et β (β_{TP}) a été représentée. Les couleurs associées aux différentes sous-unités seront utilisées pour les structures présentées dans chaque chapitre. Rose : α, vert : β, bleu : γ, orange : δ, marron : ε

avec chacune des paires catalytiques α/β, modifiant ainsi la conformation des trois interfaces catalytiques pendant la catalyse enzymatique.

La sous-unité δ assure l'assemblage du rotor en stabilisant les interactions entre la sous-unité γ et l'anneau 9 [22]. Elle est analogue de la sous-unité ε chez les ATP synthases bactérienne ou chloroplastique. Mais contrairement à celle des bactéries, la sous-unité δ des ATP synthases mitochondriales n'a aucun rôle régulateur pendant l'hydrolyse d'ATP.

La sous-unité ε est spécifique des ATPases mitochondriales. Elle n'est pas indispensable à l'assemblage de la F_1-ATPase, mais sûrement à la fonction de l'ATP synthase. En effet, les souche de levure déplétées en ATP15 (Tableau 1) sont incapables de pousser en milieu fermentescible car l'ATP synthase est inactive [23].

Pour pouvoir aborder la suite de l'introduction et comprendre la nomenclature donnée à l'ensemble des structures 3D présentées dans cette thèse, il nous est nécessaire d'expliquer comment la première structure tridimensionnelle de la F_1-ATPase bovine a été obtenue en 1994 par Abrahams *et al* [24]. Les cristaux de la partie F_1 ont été obtenus après incubation en présence d'ADP et d'AMP-PNP, analogue non hydrolysable de l'ATP. Le modèle structural présente une alternance des sous-unités α et β dans une stœchiométrie $\alpha_3\beta_3$. La couronne catalytique constituée par ces sous-unités recouvre partiellement la sous-unité γ. Cette structure à 2,8 Å montre de façon directe, et pour la première fois, que les trois sous-unités β diffèrent par leur conformation et par l'occupation du site catalytique par les nucléotides. Cette observation confirme le modèle catalytique par changement d'affinité établi par Boyer en 1973 où les trois sous-unité β sont dans des états conformationnels différents. Dans la dénomination des sites, on dira que la sous-unité β qui est occupée par l'ADP est β_{DP}, la sous-unité β occupée par l'AMP-PNP est β_{TP}, et la sous-unité vide, β_E. Les sous-unités α adjacentes aux sites catalytiques seront nommées de la même façon α_{DP}, α_{TP},

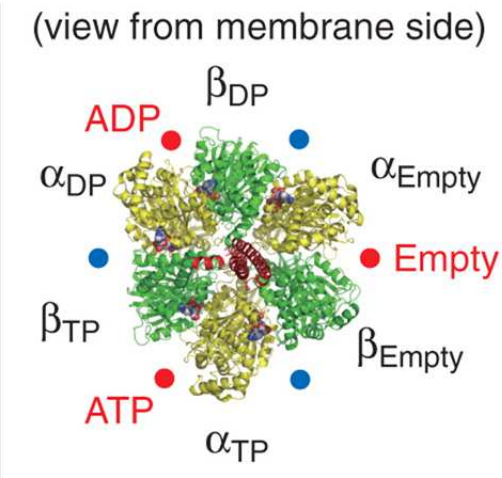


Figure 7: **F_1-ATPase et remplissage des sites catalytiques et non catalytiques**. Structure 3D de la partie F_1 obtenue en 1994 par Abrahams *et al*[24]. Vue de la membrane interne mitochondriale. Les sites catalytiques sont à l'interface des sous-unités α et β et sont représentés ici par des cercles rouges. Deux sites sont remplis par les nucléotides : l'AMP-PNP, analogue non hydrolysable de l'ATP ou l'ADP. Le troisième site est vide. Le remplissage des sites catalytiques définit les interfaces α_{TP}/β_{TP}, α_{DP}/β_{DP}, α_E/β_E. Les cercles bleus représentent la position des sites non-catalytiques

α_E (Figure 7). On parlera par la suite aussi de paire catalytique. La conformation adoptée par les paires catalytiques α/β dépend aussi beaucoup du nucléotide qui est fixé sur la site catalytique. On observe une position fermée lorsque l'ADP est fixé, une position un peu moins fermée lorsque l'ATP est fixé et une position relâchée dans la configuration vide. Cette dénomination est très importante car la dénomination des sous-unités catalytiques des structures succédant à celles-ci feront référence à ce travail [17][25][17][26][27][28][29], etc... (Figure 7). Plus tard, il sera montré que ce ne sont pas la fixation des nucléotides qui dictent le changement de conformation des paires catalytiques mais la position de γ dans le sous-complexe F_1 [30]. D'autre part, cette structure [24] a pu mettre en évidence l'existence de trois sites non catalytiques présents sur la sous-unité α qui ont tous trois fixés l'AMP-PNP (Figure 7).

Biogenèse de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*

La biogenèse de l'ATP synthase est l'étude de l'assemblage des différentes sous-unités entre elles. Ce phénomène n'est encore pas bien connu, mais des percées considérables ont été faites ces dernières années quant à la connaissance de l'assemblage de l'ATPase dans la membrane interne mitochondriale. La Figure 8 montre qu'il existe différents modules d'assemblage :

- La partie F_1
- L'anneau de sous-unités 9
- Le stator F_0 et la sous-unité 9. A vrai dire, il n'est pas exclu que le stator F_0 ne soit pas un module d'assemblage à lui seul.

Dans la biogenèse de l'ATPsynthase, le génome mitochondrial et le génome nucléaire sont sollicités pour produire les sous-unités membranaires et solubles de l'ATP synthase. Les gènes mitochondriaux, ATP6, ATP8 et ATP9 codent les sous-unités membranaires de l'ATP synthase 6, 8 et 9. Leur transcription est induite par la présence des sous-unités catalytiques au sein de la matrice

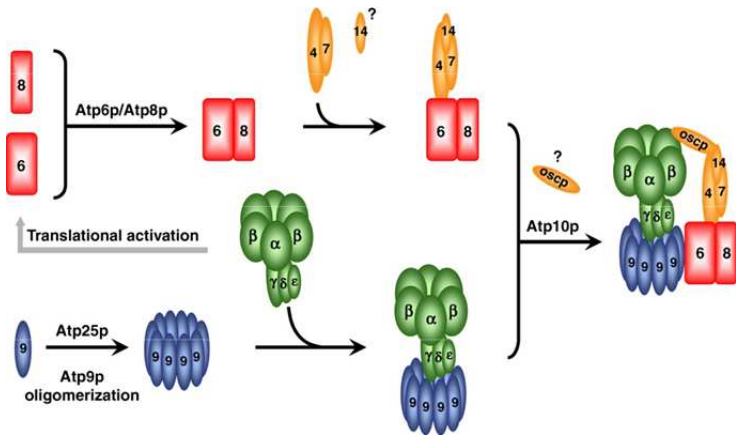


Figure 8: **Assemblage de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*. Rak *et al.* (2011)**[31] Le diagramme montre les deux voies d'assemblage de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*

mitochondriale. Les sous-unités codées par le génome mitochondrial sont tout d'abord assemblées. L'assemblage de l'anneau de sous-unités 9 nécessite la présence d'une protéine "chaperon" nommée ATP25. Une fois assemblée, la F_1-ATPase se lie à l'anneau de sous-unités 9 et active la transcription mitochondriale des sous-unités 6 et 8. Une fois que les sous-unités 6 et 8 forment un complexe, elles se lient aux autres sous-unités du pied périphérique sous le contrôle de la protéine chaperonne ATP10. Même si nos connaissances sur la biogenèse de l'ATP synthase sont encore bien maigres, il est maintenant possible de penser à produire des ATP synthases recombinantes dans des systèmes artificiels grâce à ces études et à l'identification des protéines "chaperons" qui stabilisent la formation des différents modules [31][32][33]. On peut noter que récemment, une équipe allemande a réussi à reconstituer une ATP synthase recombinante fonctionnelle dans un système artificiel liposomal (communication personnelle par Dorreen Matthies).

II Organisation supramoléculaire de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*

L'ATP synthase de *S.cerevisiae* forme des dimères dans la membrane interne mitochondriale, mais peut aussi former des structures plus complexes et s'organiser en oligomères. Cette organisation supramoléculaire au sein de la membrane semble influer fortement sur la formation et la forme des crêtes mitochondriales qui sont la base architecturale de la mitochondrie. De nombreuses études [34][35][36][37][38] ont montré qu'en plus des 14 sous-unités qui constituent l'ATP synthase fonctionnelle, trois sous-unités e, g et k étaient impliquées dans la dimérisation et l'oligomérisation des ATP synthases de levures.

C Mécanisme rotatif de l'ATP synthase

L'ATP synthase est un moteur moléculaire qui est composé d'une partie statique (stator) et d'une partie mobile (rotor). Comme il l'a été mentionné plus avant, sa rotation est induite par la *pmf* qui conduit les protons de l'espace intermembranaire à l'espace matriciel par la partie F_0 de l'ATP synthase. Mais avant de décrire ce mécanisme rotationnel, il convient de décrire une dernière fois les sous-unités qui composent le rotor et le stator.

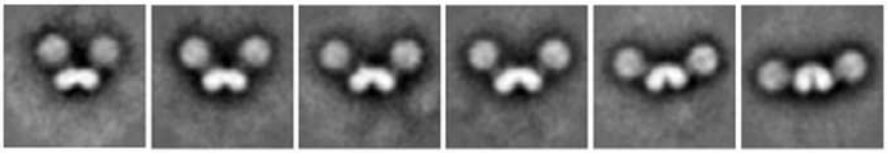


Figure 9: **Visualisation de dimères d'ATP synthases de levure par microscopie électronique**. Les clichés montrent la grande variabilité d'angle que peuvent prendre deux monomères issus d'une même membrane. [39]

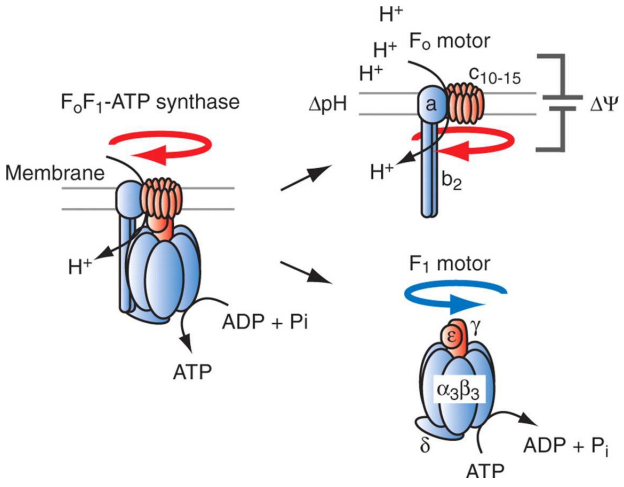


Figure 10: **Décomposition de l'ATP synthase bactérienne en rotor et stator.** En bleu, le stator et en rouge, le rotor. Les figures de droite dissocient les deux parties du rotor, celle appartenant à la partie F_0 de celle appartenant à la partie F_1. Le sens de la flèche rouge est le sens dans lequel le rotor tourne pendant la synthèse d'ATP, soit dans le sens horaire, vu depuis la membrane. Le sens de flèche bleue est le sens dans lequel le rotor tourne pendant l'hydrolyse d'ATP, soit dans le sens anti horaire.

I Composition du rotor et du stator

Le rotor. La structure 3D de l'ATP synthase de levure obtenue par Stock *et al* en 1999 [5], les expériences de pontage (entre la sous-unité γ et la sous-unité β et entre la sous-unité γ et l'anneau de sous-unité c [40][41]) ainsi que les expériences sur molécule unique [42][43] ont permis de définir les sous-unités qui composent le rotor à savoir l'anneau de sous-unités 9 inséré dans la membrane, et les sous-unités $\gamma\delta\varepsilon$ de la partie F_1. L'anneau de sous-unités 9 permet de transformer l'énergie contenue dans la *pmf* en énergie mécanique de rotation et la sous-unité γ permet de transférer cette énergie mécanique en une énergie chimique (Figure 10).

Le stator. Le stator est constitué de la couronne $\alpha_3\beta_3$ de la partie F_1 ainsi que de l'ensemble de la partie F_0 excepté l'anneau de sous-unités 9. Le pied périphérique et l'OSCP permettent d'immobiliser la couronne catalytique $\alpha_3\beta_3$ de manière à ce qu'elle ne soit pas entraînée par le mouvement de la sous-unité γ et qu'elle puisse subir les changements conformationnels imposés par la rotation de γ au niveau des différentes interfaces catalytiques. Le stator comprend aussi la

sous-unité 6 (homologue de la sous-unité a de *E.coli* ou de *B.taurus*) qui permettrait la conduction des protons de l'espace intermembranaire aux sous-unités 9 du rotor et leur retour dans la matrice (Figure 10).

II La translocation des protons induit le mouvement du rotor

La translocation des protons est encore mal connue. L'absence de structure tridimensionnelle de la partie F_0 nuit à la compréhension de ce phénomène et ne permet pas de valider les hypothèses qui ont été faites sur la translocation des protons [44][45]. De plus, c'est un phénomène qu'il n'est pas aisé car les études fonctionnelles de couplage entre transport de protons et synthèse d'ATP sont très difficiles. Enfin, dans les ATP synthases mitochondriales, les sous-unités 6, 8 et 9 sont codées par le génome mitochondrial, ce qui rend l'obtention de mutants plus délicates. C'est pourquoi les études de translocation de protons sont bien souvent effectuées sur les ATP synthases bactériennes d'*E.coli* ou de *I.tartaricus*. Les données obtenues par Vik *et al* [45][46] montrent qu'il existe chez *E. coli* et *I.tartaricus* deux résidus très conservés et cruciaux pour la translocation des protons du périplasme au cytoplasme : Un Asp ou un Glu sur la sous-unité c et une Arg sur la sous-unité a. Il est plus ou moins accepté que la translocation des protons à travers la sous-unité a se fait à l'aide de deux demi-canaux à protons [44][45]. Un proton rentre par le demi-canal exposé à l'espace périplasmique et est transféré au groupement carboxylate présent sur la sous-unité voisine de ce demi-canal. La neutralisation du groupement carboxylate autorise la rotation de la sous-unité c dans le sens antihoraire et permet ainsi de protoner chaque carboxylate successivement. Après avoir fait un tour de 180°, la sous-unité c contenant le proton est mise face au deuxième demi-canal exposé face au cytoplasme. Le deuxième demi-canal qui possède un environnement hydrophile déprotone ainsi la sous-unité c et permet le relargage du proton dans le cytoplasme (Figure 11).

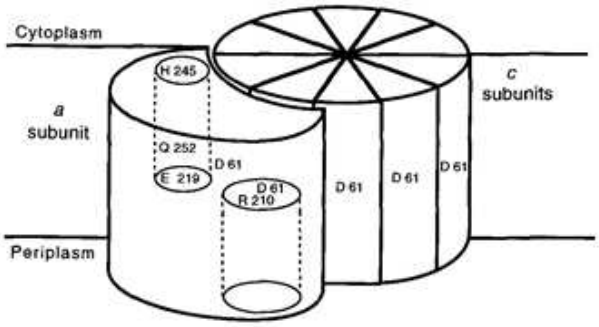


Figure 11: **Modèle de translocation des protons à travers la sous-unité a et l'anneau c**[45][44].

III Mise en évidence du mécanisme de rotation de l'ATP synthase

Après la publication du modèle structural de la partie F_1 en 1994 par l'équipe de John Walker, plusieurs études ont tenté de montrer directement la rotation de F_1. Des expériences sur ATP synthases bactériennes ont permis de révéler que le pontage entre l'anneau de sous-unités c et la sous-unité γ n'empêchait pas la synthèse d'ATP [40] mais que le pontage entre l'anneau de sous-unités c et la sous-unité a la supprimait [41]. Mais les expériences les plus marquantes et les plus

directes sont celles effectuées sur molécule unique qui ont permis de mettre en évidence la rotation des deux parties du rotor F_0 et F_1 (Figure 12(a) et 12(b)). Le principe de l'étude est de fixer la couronne catalytique $\alpha_3\beta_3$ étiquetée avec un $(His)_6$ sur un support Nickel-NTA de façon à ce que le stator F_1 reste immobile. Un filament d'actine fluorescent de 0,6 à 4 μM de long et de 10 nm de large est attaché à la sous-unité γ ou à l'une des sous-unité c de l'anneau c. Après addition d'ATP, la rotation du filament a été observée dans le sens anti-horaire, vue depuis la partie F_0. Par la suite, le filament d'actine a été remplacé par des billes de polystyrène, des billes d'or colloïdales, des billes magnétiques car les forces de frictions entre le filament d'actine et le solvant ralentissait la rotation de γ. Quelle que soit la sonde utilisée, ces expériences ont montré que, pendant l'hydrolyse d'ATP, la direction de la rotation se faisait dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, vu depuis la partie F_0. Ces expériences ont permis de subdiviser la rotation de la sous-unité γ en différentes étapes. La rotation de γ peut-être subdivisée en deux sous-étapes et cette subdivision permet l'identification des étapes de fixation d'ATP, d'hydrolyse d'ATP et de relargage d'ADP. Ainsi, Nishizaka *et al* [47] ont montré que la rotation de 120˚ pouvait être disscociée en une étape de 80˚ correspondant à la fixation d'ATP sur un site vide et simultanément à la libération du phosphate inorganique et une étape de 40˚C correspondant au relargage de l'ADP [48](Figure 12(c)). Par ailleurs, en utilisant un champ magnétique, , il a été possible de forcer la rotation sur des ATP synthases auxquelles on a greffé une bille magnétique sur le rotor, dans le sens horaire et de provoquer ainsi la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi [49]. Ces expériences de rotation de la partie F_1 sont une confirmation directe du modèle catalytique établi par Boyer que nous allons décrire dans la section suivante.

D Mécanisme catalytique de l'ATP synthase

La nécessité de créer un gradient de protons artificiel au sein de liposomes rend l'étude de la synthèse d'ATP assez difficile c'est pourquoi la catalyse de l'enzyme est étudiée majoritairement dans le sens de l'hydrolyse d'ATP. Même si la structure de la partie F_1 et le mécanisme de changement d'affinité sont bien connus, il n'en reste pas moins que certaines zones d'ombre subsistent dans le mécanisme catalytique.

I Le modèle de changement d'affinité établi par Paul Boyer

Le mécanisme de changement d'affinité établi par Paul Boyer a constituée une grande percée dans la compréhension du mécanisme catalytique de l'ATP synthase. Selon son modèle, la synthèse d'ATP dépend de rotations de 120˚ de la sous-unité γ qui déforment successivement les trois sites catalytiques. A un même instant, les trois sites catalytiques sont dans trois conformations différentes (O : Open, T : Tight, L :loose) qui conditionnent l'état d'occupation des sites catalytiques par les nucléotides. Ces différents états vont maintenant êtres décrits dans le sens de synthèse d'ATP :

1. **La fixation de l'ADP et du P_i**
   L'ADP et le P_i se fixent sur un site catalytique en conformation "Open" (O) qui change directement de conformation vers une forme dite "Tight" (T). Ce changement de conformation est provoqué par la première rotation de la sous-unité γ qui déforme les différents sites catalytiques.
2. **L'état de transition**. Avant la catalyse l'ADP et le P_i sont fortement liés à l'enzyme. Une nouvelle rotation de γ entraîne le changement de conformation suivant T (Tight) $\longrightarrow$ L (loose). Cette dernière conformation permet de synthétiser et de stabiliser l'ATP.

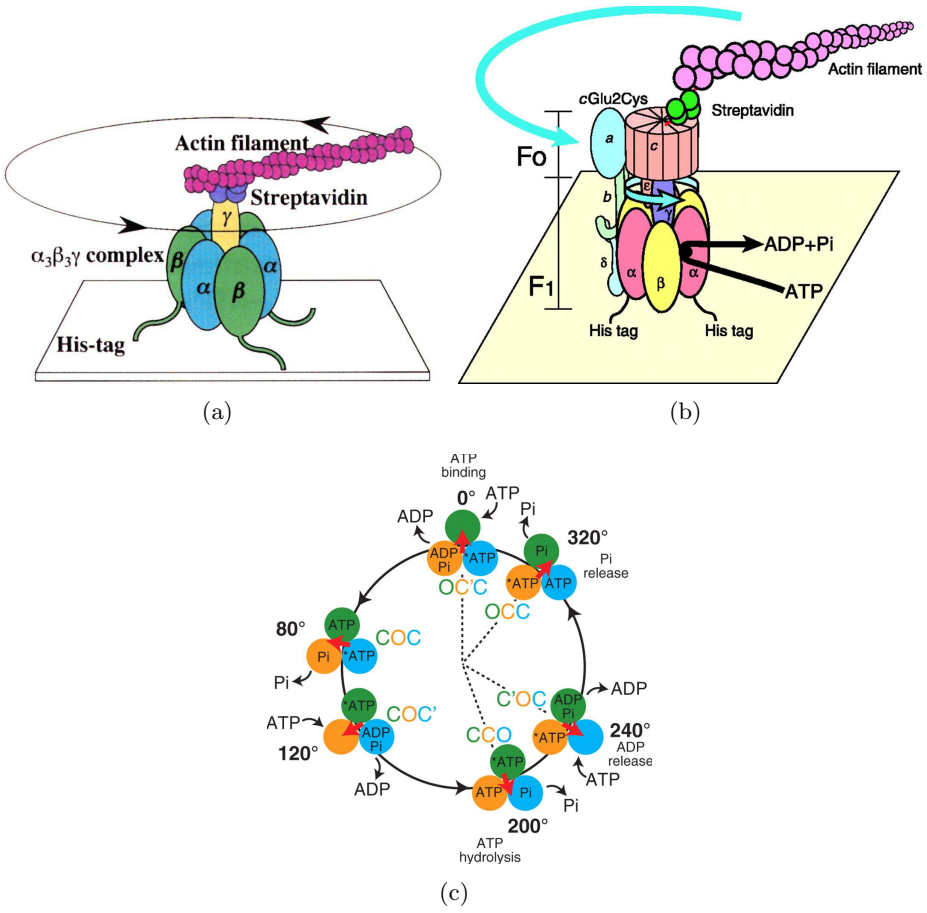


Figure 12: **Mise en évidence de la rotation de la F_1F_0-ATP synthase**(a) Mise en évidence de la rotation de la sous-unité γ chez *Thermophilus Bacillus PS3* [42], (b) Mise en évidence de la rotation de l'anneau c [43]. (c) Cycle catalytique et rotation de γ [48].

3. **La libération d'ATP.** Une nouvelle rotation de γ entraîne le passage Etat L (loose) $\longrightarrow$ Etat O (Open)

II Les différents régimes catalytiques

La F_1 ATPase possède différents régimes d'hydrolyse d'ATP qui dépendent de la concentration en MgATP. Deux de ces régimes sont bien caractérisés.

1. Lorsque la concentration en ATP est substœchiométrique, la fixation d'ATP se fait à haute affinité sur un seul site catalytique. Le turnover de l'enzyme est très lent et n'est réalisé que sur un seul site catalytique. Chez *E.coli*, Weber et Senior mesurent une vitesse d'hydrolyse d'ATP de 0,1 s^{-1} et vitesse de relargage de l'ADP de 0,001 s^{-1} [50]. Ce régime appelé **catalyse unisite** est un évènement qui ne dépend absolument pas de la rotation de la sous-unité γ [51].
2. A substrat saturant, les trois sites catalytiques interviennent pendant l'hydrolyse ou la synthèse d'ATP. C'est la **catalyse multi-sites**. Les études effectués par Weber et Senior en 1997

supportent l'idée que, dans la cellule, la concentration en ATP est telle (mM) que les trois sites catalytiques de l'enzyme sont remplis et interagissent entre eux de manière coopérative pendant la synthèse d'ATP [52][53][50]. Le turnover catalytique de l'enzyme ($\sim$100 s^{-1}) est dans ce cas 1000 fois plus rapide qu'en catalyse unisite [51]. D'autres données suggèrent que lors de la catalyse, deux sites sont seulement remplis, laissant toujours un troisième site vide [54][55][56]. L'existence d'une catalyse bi-site ou tri-site à substrat saturant fait l'objet d'un débat sans fin depuis une quinzaine d'années.

III Le rôle des sites non catalytiques

Les sites non-catalytiques coopèrent avec les sites catalytiques pendant la catalyse de l'enzyme. En effet les études d'hydrolyse montrent que la fixation des nuclétotides sur les sites non catalytiques conditionne le fonctionnement de l'enzyme. En 1990, Milgrom *et al* ont montré que la fixation d'ATP sur les sites non catalytiques était indispensable à l'activité hydrolytique de l'enzyme [57]. D'autres équipes ont montré un effet inhibiteur de l'ADP lorsqu'il était fixé sur les sites non-catalytiques [58][59][60]. De plus, il semblerait que la fixation d'ATP sur un site non catalytique empêche l'inhibition de l'hydrolyse d'ATP par fixation de l'ADP sur un site catalytique. Dans le sens de la synthèse d'ATP, les sites non catalytiques ne semblent pas aussi primordiaux pour la catalyse [61], mais semblent potentialiser la synthèse d'ATP d'un facteur 2 [62].

E Mécanisme de régulation de l'ATP synthase mitochondriale

L'ATP synthase, enzyme essentielle à la production d'ATP, doit comme tout enzyme être régulée pour éviter les dysfonctionnements dans l'énergétique cellulaire. L'hydrolyse tout comme la synthèse d'ATP sont régulées de différentes manières. La régulation de la synthèse d'ATP ne se fait pas par l'action d'un inhibiteur spécifique mais essentiellement par modulation de la *pmf*. L'hydrolyse d'ATP, elle, est provoquée par la chute de la *pmf* en cas d'hypoxie, d'anoxie ou encore en phase préapoptotique. Il n'existe qu'un seul mécanisme qui bloque instantanément cette hydrolyse : l'inhibition de l'ATPase par le peptide endogène IF1.

I Inhibiteurs et sites de fixation dans les ATP synthases mitochondriales

Avant de décrire le mécanisme inhibiteur, nous énumérerons les quelques inhibiteurs de l'ATP synthase. L'étude de la régulation de l'ATP synthase et la connaissance des molécules inhibitrices de l'ATP synthase sont des éléments importants pour comprendre le fonctionnement de l'enzyme. Depuis quelques années, la découverte du peptide IF1, peptide inhibiteur naturel de l'ATPase mitochondriale ainsi que celle d'autres molécules ont fortement contribué à préciser le mécanisme catalytique de l'enzyme lors de l'hydrolyse d'ATP. Dans le Tableau 2, plusieurs molécules qui inhibent l'ATP synthase/ase sur les deux parties F_0 et F_1 de l'ATP synthase sont rassemblées. Nous avons choisi ici de présenter les molécules majeures ainsi que leurs sites de fixation qui ont été déterminés à l'aide d'études cristallographiques à haute résolution.

1. sur F_0 :
   Il existe notamment deux inhibiteurs, le DCCD et l'oligomycine, qui inhibent le transport des protons à travers la partie F_0
2. sur F_1, il existe cinq sites de fixation aux inhibiteurs (Figure 13) :

– Les sites catalytiques sur lesquels se fixent les analogues non hydrolysable de l'ATP, les analogues covalent des nucléotides
– Les deux sites de fixation de l'aurovertine
– Le site de fixation de l'efrapeptine
– Le site de fixation d'IF1

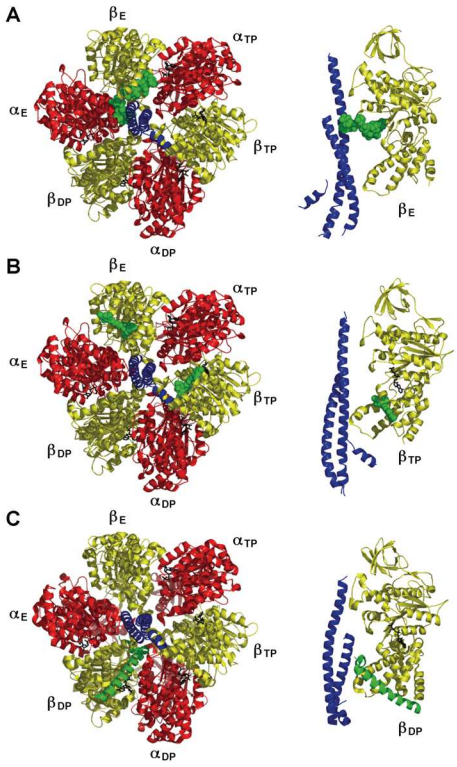


Figure 13: **Sites de fixation de l'efrapeptine, de l'aurovertine et de l'IF1 sur la F_1-ATPase bovine**. Gledhill *et al.* (2006) (A) Site de fixation de l'efrapeptine. A gauche, vue depuis la partie F_0. L'efrapeptine (en vert) se fixe sur un site unique dans la cavité de l'enzyme. Elle interagit avec la sous-unité catalytique β_E et la sous-unité γ. A droite, vue latérale dans laquelle on distingue les sous-unité γ et β_E avec lesquelles l'efrapeptine interagit. (B) Sites de fixation de l'aurovertine. A gauche, vue depuis la partie F_0. L'aurovertine (en vert) se fixe sur la sous-unité β_{TP} et β_E. Le site β_{DP} est inaccessible à l'inhibiteur. A droite, vue latérale dans laquelle on peut voir que l'aurovertine (en vert) interagit avec la sous-unité β_{TP} (en jaune). (C) Site de fixation d'IF1. A gauche, vue depuis la partie F_0. IF1 (en vert) est fixé entre les sous-unités catalytiques α_{DP} et β_{DP} et interagit avec la sous-unité γ.

II L'inhibition de l'ATPase mitochondriale par le peptide endogène IF1

Lorsque la membrane est désenergisée dans les cas d'anoxie ou d'hypoxie, ou en phase préapoptotique, la force protomotrice est faible ou inexistante et l'ATP synthase se met à hydrolyser l'ATP. Pour éviter cette hydrolyse futile d'ATP, la cellule utilise un système de régulation rapide qui la bloque presque instantanément. Dans les ATP synthases mitochondriales, le peptide IF1 vient s'insérer entre les sous-unités α et β d'une interface catalytique qu'il bloque dans la configuration

	Inhibiteurs	Origine	ATPases inhibées
$\mathbf{F}_0$	DCCD	Molécule synthétique	Canal à protons
	Oligomycine	Streptomyces	Canal à protons
$\mathbf{F}_1$	IF1	mitochondries	mitochondriales
	stf1p	mitochondrie de levure	mitochondriales de *S.cerevisiae*
	Melittin	Venin d'abeille (Apitoxine)	mitochondriales
	$SynA_2$, SynC	mitochondries	mitochondriales
	Aurovertin	antibiotique (Calcarisporium arbuscula)	mitochondriales et bactériennes
	Resveratrol	polyphenols	mitochondriales et bactériennes
	Piceatannol	polyphenols	mitochondriales et bactériennes
	Efrapeptine	antibiotique (Tolypocladium niveum)	mitochondriales et bactériennes

Tableau 2: Quelques inhibiteurs de l'ATP synthase mitochondriale

α_{DP}/β_{DP} en empêchant, par ailleurs, la rotation de la sous-unité γ (Figure 14). Dans cette dernière partie d'introduction, nous nous attacherons particulièrement à décrire les connaissances que nous avons à ce jour sur le peptide et son mode d'inhibition.

L'interaction IF1-F_1 a fait l'objet de nombreuses études biochimiques depuis la découverte d'IF1 en 1963 par Pullman et Monroy [63]. La plupart des données obtenues sont issues du système bovin [64][65][66][67][68][69], c'est pourquoi nous ferons référence à ce modèle de nombreuses fois dans ce manuscrit.

Description de l'IF1 de *B.taurus*

L'IF1 bovin est un peptide de 84 acides aminés dont la séquence est assez conservée. Les données structurales que nous avons du peptide montrent que l'IF1 bovin est majoritairement structuré en hélice-α de l'acide aminé 19 à l'acide aminé 83 [69]. On pourrait diviser le peptide bovin en trois parties [65][66][70][71][72] :

- La partie N-terminale qui s'étend du résidu 1 à 22 dont on définira le rôle chez *S.cerevisiae*.
- La partie médiane est la région inhibitrice du peptide. La région 14-47 est définie comme la région minimale nécessaire à l'inhibition de l'ATPase. C'est aussi la région qui est impliquée dans la tétramérisation du peptide à pH supérieur à 6,5. Des descriptions plus détaillées seront données dans le Chapitre 1.
- La partie C-terminale qui ne joue aucun rôle dans l'inhibition mais un rôle dans la dimérisation du peptide bovin.

D'autres données biochimiques et structurales montrent que le peptide adopte plusieurs formes oligomériques (dimère/tétramère) qui dépendent du pH [67][69]. Le dimère est inhibiteur et est prédominant à pH inférieur à 6,5. En revanche, le tétramère est non-inhibiteur et est prédominant à pH supérieur à 6,5. Chez *S.cerevisiae*, des données biochimiques nous renseignent sur les caractéristiques du peptide. Nous savons que le peptide est plus court que celui des mammifères, notamment en C-ter, car il contient 63 acides aminés. Tout comme l'IF1 bovin, il existe différentes formes oligomériques de l'IF1 de *S.cerevisiae*, cependant l'IF1 se retrouve soit sous forme monomérique soit sous forme

dimérique[73]. La forme tétramérique n'existe pas *chez S.cerevisiae*. L'IF1 monomérique est inhibiteur. En revanche aucune donnée biochimique ne montre le caractère inhibiteur ou non de l'IF1 dimérique. En l'absence de données structurales il nous est difficile de connaître les zones d'interactions entre deux monomères d'IF1 lors de la formation du dimère. Un des enjeux de cette thèse sera de caractériser le peptide de levure et sa forme dimérique. D'autre part, chez *S.cerevisiae*, il existerait trois autres peptides régulateurs Stf1p, Stf2p et Stf3p. Leurs caractéristiques physiologiques, structurales, leur mode d'expression et d'action sont encore bien obscures. Stf1p semblerait avoir des caractéristiques communes à IF1. Sa séquence de 63 acides aminés serait similaire à celle d'IF1 et son effet inhibiteur identique à celui d'IF1. Son affinité pour l'enzyme serait cependant plus faible que celle de l'IF1 [74]. Peu de données ont été obtenues pour le peptide Stf2p mais il semblerait qu'il joue un rôle dans la stabilisation lors de l'inhibition de l'ATPase [75][76]. Quant à Stf3p, il est homologue de Stf2p mais n'a jamais été isolé sous forme de protéine.

Spécificité d'action d'IF1 pour les ATP synthases mitochondriales

IF1 agit spécifiquement sur les ATP synthases mitochondriales et n'a absolument aucun effet *"in vitro"* sur les ATP synthases bactériennes et chloroplastiques [73] qui possèdent leur propre mécanisme d'inhibition, intrinsèque à l'enzyme [77][78]. En effet, dans *E.coli* et d'autres bactéries, la partie C-ter de la sous-unité ε dans ces ATP synthases, est susceptible de se déployer et de s'intercaler entre les sous-unités α et β et le long de la sous-unité γ de l'ATP synthase en inhibant spécifiquement l'hydrolyse d'ATP [79]. Dans la bactérie *Thermophilus PS3*, la fixation d'ATP sur cette sous-unité stabilise la forme repliée, autorisant ainsi la synthèse ou l'hydrolyse d'ATP [80][81][82].

Pour en revenir à IF1, il semble interchangeable d'un organisme à un autre mais il semble que cette règle ne soit pas valable pour tous les organismes. En effet, il a été montré que l'IF1 de *B.taurus* et celui de *S.cerevisiae* pouvait inhiber les ATP synthases de boeuf, de levure et de pomme de terre [73][83]. En revanche, il a été montré que le pouvoir inhibiteur du peptide IF1 de pomme de terre sur l'hydrolyse d'ATP par les ATP synthases bovines et de levure était quasiment nul [83].

Mécanisme d'inhibition du peptide

Schwerzmann et Pedersen ont montré en 1986 [84] que le peptide n'agissait qu'en absence de force protomotrice. Le peptide se fixe alors entre les sous-unités d'une interface catalytique α/β dont on ne connaît pas la conformation. La fixation du peptide bloque le cycle enzymatique en empêchant la rotation de l'enzyme. La structure du cristal obtenue par Gledhill *et al* [27][28] montre que le peptide est intercalé entre les sous-unité α_{DP} et β_{DP} dans la configuration finale du complexe inhibé (Figure 14). Lorsque la membrane est à nouveau énergisée, le peptide est éjecté de son site de fixation par la rotation forcée de la sous-unité γ dans le sens de l'activité synthase de l'ATP synthase. Son action est donc unidirectionnelle. Cependant, des études ont montré qu'à des concentrations anormalement élevées, le peptide IF1 pouvait inhiber la synthèse d'ATP en modulant la dimérisation des ATP synthases ou en inhibant directement la synthèse d'ATP dans les cellules cancéreuses [85][86].

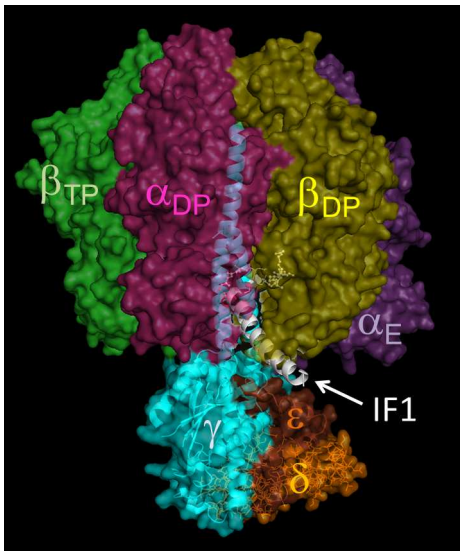


Figure 14: **Structure tridimensionnelle du complexe inhibé IF1-F_1-ATPase de *B.taurus*. Gledhill *et al.* (2007)**[27][28]

F Présentation du travail de thèse

Dans cette thèse nous avons choisi de présenter les résultats que nous avons obtenus sur le mécanisme de régulation de l'ATPase mitochondriale de *S.cerevisiae* par son peptide endogène IF1. Dans une première partie, il sera question de décrire la structure du peptide et les différentes formes adoptées par celui-ci en fonction du pH. L'oligomérisation de l'IF1 de *S.cerevisiae* sera étudiée grâce aux outils de mutagenèse et aux techniques de marquage de spin couplées à de la spectroscopie RPE. Dans une deuxième partie, il sera question d'étudier les spécificités moléculaires de l'ATP synthase mitochondriale et de les corréler au mécanisme d'inhibition d'IF1. Enfin, les étapes du mécanisme d'inhibition de l'ATPase de levure par son peptide IF1 seront détaillées en réalisant des cinétiques d'inhibition sur des mutants d'IF1 et de l'ATPase.

Deuxième partie

MATÉRIELS ET METHODES

G MODIFICATION ET PRODUCTION D'IF1

Biologie Moléculaire

I Les outils

Les souches de bactéries *E.coli* utilisées

3 souches bactériennes *E.coli* ont été utilisées :

- **La souche XL_1-Blue**
- **Les souches d'*E.coli* XL_1-Blue et DH5-α** sont des bactéries qui peuvent être rendues compétentes pour la transformation chimique ou l'électroporation.
- **La souche BL21DE3** est une souche d'expression de protéines. Elle nécessite la présence d'un gène lacZ sur le plasmide de choix et l'expression protéique est induite par 0,5 mM-1mM IPTG. La Figure 15 décrit le principe d'expression protéique dans cette souche.

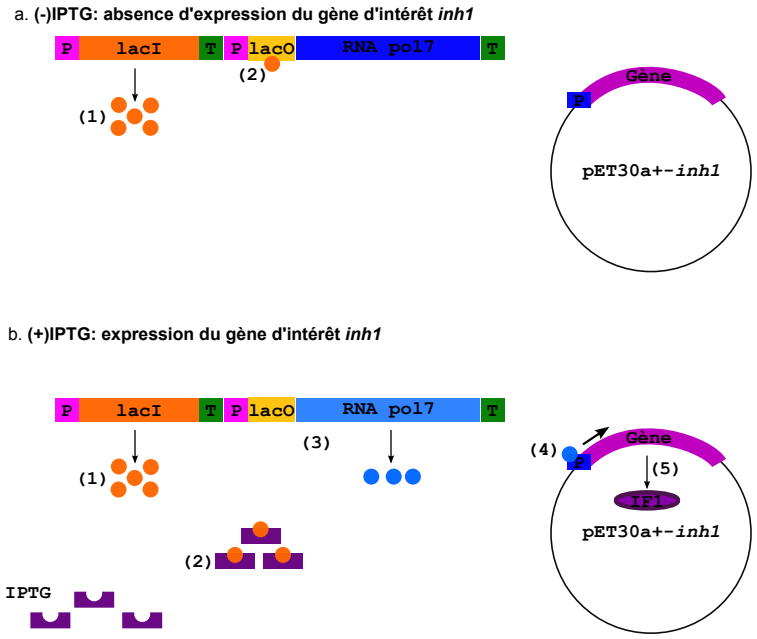


Figure 15: **Principe de surexpression protéique dans la souche *E.Coli* BL21DE3**. Le sytème d'induction est basée sur le fonctionnement de l'opéron lactose. Dans la souche BL21DE3, les gènes de l'opéron lactose sont remplacés par le gène codant l'ARN polymérase (cassette DE3). L'expression de l'ARN polymérase 7 est induite par la présence d'IPTG qui empêche la fixation du répresseur lacI sur l'opérateur O. Ainsi l'ARN polymérase se fixe sur le promoteur T7, présent sur le plasmide $pET30a^+$-*inh1* et induit l'expression protéique du gène d'intérêt *inh1*.

Le vecteur d'expression pET/inh1

$pET30a^+$ est un vecteur réplicatif multi-copies qui est utilisé pour la surexpression de protéines dans les souches de bactéries BL21DE3. Il est utilisé ici comme vecteur d'expression pour produire les peptides d'IF1 wT ou d'IF1 modifié. Il contient le gène *inh1* qui code le peptide IF1. Dans la

séquence du gène, le codon TTC codant la phenylalanine 28 a été remplacé par TGG codant un tryptophane. Cette modification est nécessaire pour suivre la purification du peptide par absorbance à 280 nm. Les propriétés inhibitrices ont été vérifiées comme étant identiques à celles de l'IF1 wT. Ce peptide IF1 F28W est nommé IF1 wT dans l'ensemble de cette thèse.
Les différents mutants d'IF1 qui ont été utilisés pendant cette thèse pour étudier l'oligomérisation du peptide IF1 et le rôle de la partie N-terminale d'IF1 dans l'inhibition de l'ATPase de *S. cerevisiae* ont été créés par

- **mutagenèse dirigée pour les mutations ponctuelles** : IF1 F28W, IF1 E33C, IF1 L54C, IF1 E33C E21A, IF1 L54C E21A, IF1H39C, IF1 Δ1-13, IF1 Δ1-14 , IF1 Δ1-15, IF1 Δ1-16, IF1 Δ1-17, IF1 F17S
- **clonage pour l'ajout d'un peptide ou d'une protéine** : PsaE-IF1

PCR de mutagenèse dirigée/Clonage

PCR de mutagenèse. Les PCR de mutagenèse dirigée ont été réalisées grâce au kit de mutagenèse Quickchange (Stratagene) ou en utilisant la Phusion® polymerase. Le principe de mutagenèse est décrit dans la Figure 16 et les séquences des oligonuclétides utilisés sont détaillées dans les Tableaux **??** et 6.

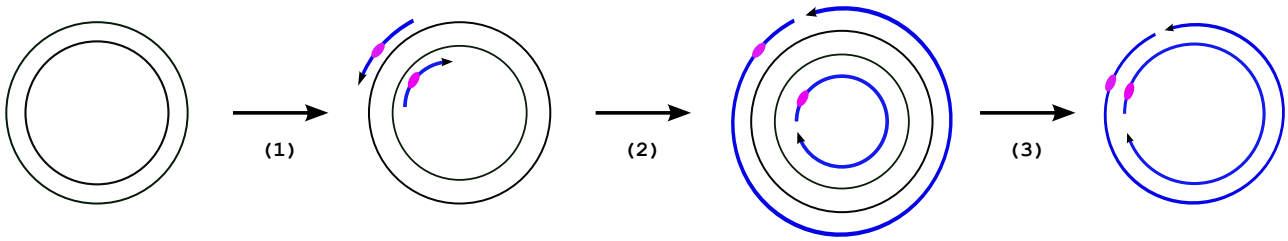


Figure 16: **Principe de mutagenèse dirigée**. **(1)** L'ADN est dénaturé à 95˚C. Les 2 brins d'ADN sont dissociés l'un de l'autre et les oligonucléotides (20-45 pdb) peuvent s'apparier aux 2 brins de la matrice d'ADN. **(2)** L'ADN matrice est amplifié par une ADN polymérase *Pfu* turbo ou Phusion. **(3)** Après 12 à 18 cycles d'amplification, l'ADN matrice méthylé est digéré par DpnI. Les brins mutés sont alors transformés dans *E.coli* (DH5-α ou XL_1-Blue).

Clonage. Les inserts et vecteurs sont digérés par le même couple d'enzymes de restriction ou endonucléases de restriction. Ces enzymes ont été utilisées conformément aux insttructions du fournisseur New England Biolabs. Après coupure, les différents fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. Les bandes sont révélées par UV grâce à la fluorescence du "SYBR® safe". Celles qui correspondent au poids moléculaire attendu sont découpées et purifiées en utilisant le kit Nucleobond extract II-Macherey-Nagel. La ligation des inserts et des vecteurs est effectuée en utilisant la Quick-ligase ou la T4 DNA ligase.

II Description et création des différents mutants d'IF1

Étude de l'oligomérisation d'IF1. Les mutants d'IF1 cystéiques sont décrits dans la Figure 17. Dans le Tableau **??** sont reportées toutes les séquences d'oligonuclétides utilisées pour les

mutagenèses dirigées.

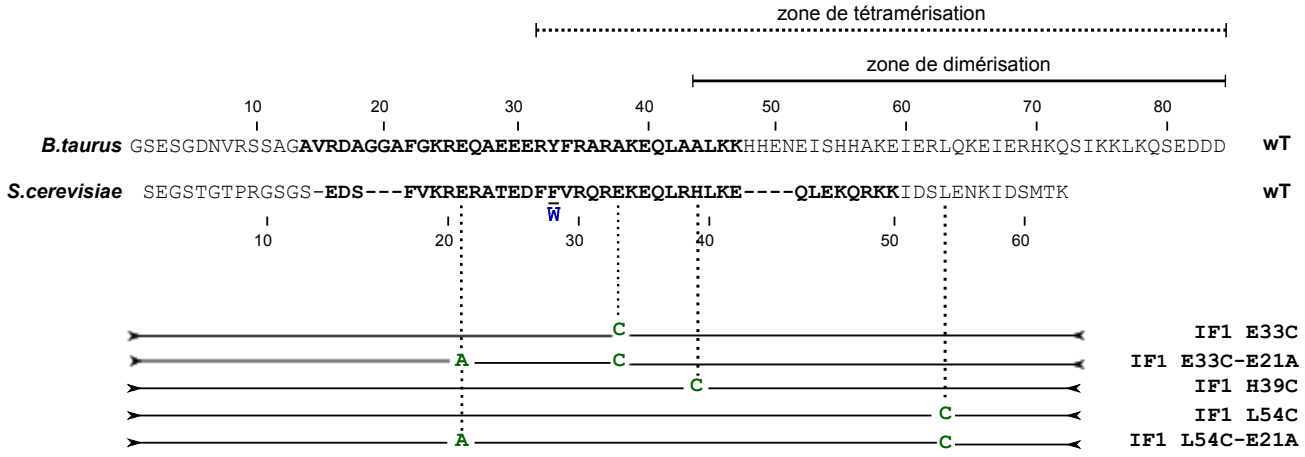


Figure 17: **Description des IF1 cystéiques de *S.cerevisiae*.** La séquence encadrée en rose désigne la séquence minimale inhibitrice chez *B.taurus* et *S.cerevisiae*. La phénylalanine 28 de *S.cerevisiae* a été remplacée par un tryptophane pour pouvoir suivre la purification du peptide par absorption à 280 nm.

Étude du rôle de la partie N-terminale d'IF1 dans l'inhibition de l'ATPase. Les mutants d'IF1 créés par mutagenèse ou clonage pour l'étude du rôle de la partie N-terminal dans l'inhibition de l'ATPase sont décrits dans la Figure 18. Dans le Tableau **??** sont reportées toutes les séquences d'oligonucléotides utilisés pour les mutagenèses dirigées.

Clonage de *PsaE* dans pET30a$^+$-*inh1*.
Le gène *PsaE* de *Synecchocystis sp. 6803* contenu dans le plasmide pRSET, codant la protéine PsaE (Photosystème I) a été cloné dans le plasmide pET30a$^+$ à l'extrémité 5' du gène *inh1*. Pour ce clonage, deux sites de restrictions *Bam*H1 et NdeI ont été utilisés. Le site *Bam*H1 a été introduit par PCR à l'extrémité 5' du gène *PsaE* et à l'extrémité 5' du site NdeI situé dans pET30a$^+$-*inh1* (Tableau **??**). Après transformation des bactéries XL_1-Blue par choc thermique à 42°C pendant 42 secondes, les clones positifs contenant la construction pET30a$^+$-*PsaE-IF1* sont sélectionnés pour pousser dans un milieu LB liquide sélectif (30μg/mL de kanamycine), toute la nuit, à 37°C. Les constructions génomiques sont extraites, purifiées par miniprep (Qiagen GmbH/Macherey-Nagel) puis vérifiées par séquencage (Eurofins MWG Operon).

Biochimie

III Production et purification des peptides

Transformation des clones positifs par électroporation

Les plasmides contenant la construction pET30a$^+$-*inh1* ou pET30a$^+$-*inh1* muté sont introduits par électroporation dans un système hétérologue bactérien d'expression compétent *Escherichia coli*

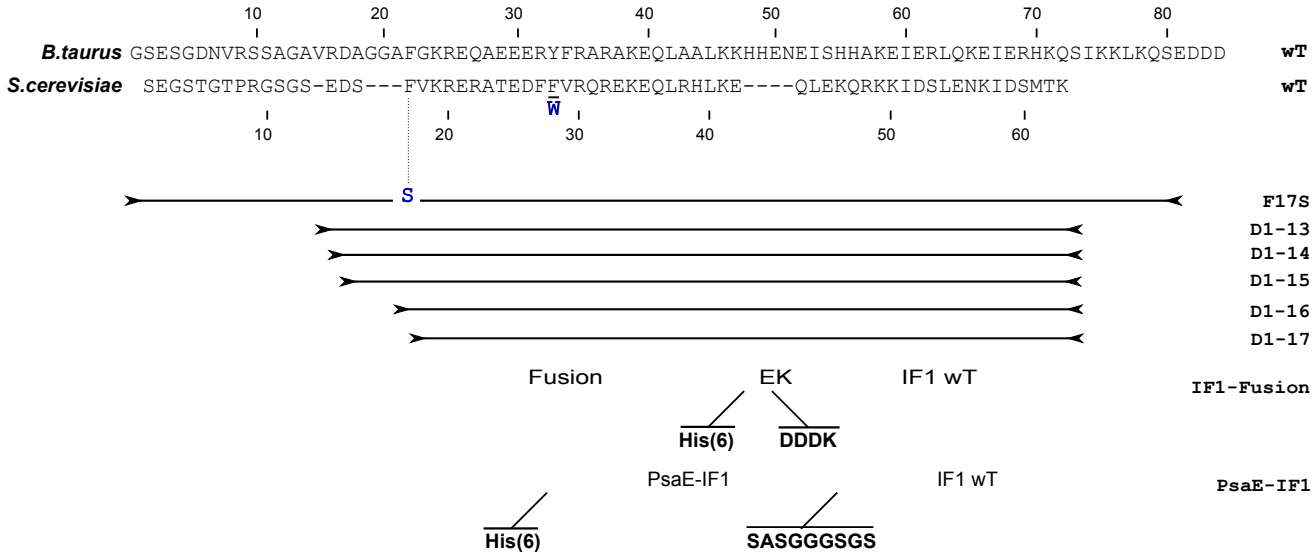


Figure 18: **Description des IF1 de *S.cerevisiae* modifiés en N-terminal**.

BL21(DE3). Les bactéries transformées poussent toute la nuit, à 37°C sur une boîte de Pétri contenant 20 mL de LB + 30μg/mL de kanamycine.

Surexpression du peptide

Une colonie est repiquée dans 10 mL LB contenant 30μg/mL de kanamycine. Après 12h de mise en culture à 37°C, 5 mL de culture sont repris dans 500 mL de LB. La surexpression d'IF1 est induite par ajout de 0,5 mM d'IPTG dès que la DO_{600nm} atteint une valeur comprise entre 0,6 et 0,8. Après 3 heures de surexpression, les milieux sont centrifugés pendant 20 min à 4000 rpm. Les culots sont ensuite repris dans du tampon A (0,3M NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 ajusté à pH 6,5) contenant 10 mM imidazole. La surexpression est contrôlée par analyse de gel SDS-PAGE 12 % contenant des échantillons protéiques "avant" et "après surexpression" dénaturés à 95°C pendant 3 minutes.

Lyse cellulaire

Après une heure d'incubation sous agitation douce dans un coktail d'enzymes, DNase et RNase à 10μg/mL, lysozyme 0,5 mg/mL, PMSF 1 mM, les bactéries BL21DE3 sont soniquées dans la glace 3x45 secondes avec 2 minutes d'intervalle entre chaque sonication, puis aliquotées par volume de 4 mL.

Purification d'IF1 sur colonne Nickel

4 mL de lysat cellulaire sont ensuite introduits dans une colonne Ni-NTA préalablement équilibrée avec 10 mM imidazole tampon A, puis mis en batch pendant 1 heure à température ambiante. 2 protocoles peuvent être ensuite appliqués selon le type d'IF1 utilisé :

Mutation	Séquence des oligonucléotides (5'→3')	Plasmides
IF1 F28W	CTCACGCTGCCTAACCCAGAAGTCTTCCGTGGCCCT	pET30a$^+$
IF1 cystéiques		
1. IF1 E33C	CTGGGTTAGGCAGCGTTGCAAGGAGCAACTACG	pET30a$^+$
2. IF1 L54C	CATCGAGTCAATTTTATTTTCGCAAGAATCAATCTTCTTTCGTTG	pET30a$^+$
3. IF1 E33C E21A	GAGGATTCGTTTGTTAAAAGGGCGAGGGCCACGGAA	pET30a$^+$
4. IF1 L54C E21A	GAGGATTCGTTTGTTAAAAGGGCGAGGGCCACGGAA	pET30a$^+$
5. IF1 H39C	CCAGTTGTTCTTTCAAACAGCGTAGTTGCTCC	pET30a$^+$
IF1 N-terminal		
a. Insertion de 9 codons + *Bam*H1	GGTGATCAATTTAACGGTATAGGATGCGGATCCGGAGCCACCGCCGCTAGCAG	pRSET
b. Insertion de *Bam*H1	GGTACCGACGACGACGGATCCTCTGAAGGTTCTACCGGGC	pET30a$^+$
c. Addition de $His_{(6)}$ en Nter de PsaE-IF1	GAAGGAGATATACAGATGCACCATCACCATCACCACGCCTTAAATCGTGG	pET30a$^+$
d. IF1 Δ1-13	CTGGGTACCGACGACGACGACAAGGAGGATTCGTTTGTTAAAAGGGAAAGG	pET30a$^+$
e. IF1 Δ1-14	CGACGACGACGACAAGGATTCGTTTGTTAAAAGGG	pET30a$^+$
f. IF1 Δ1-15	CGACGACGACGACAAGTCGTTTGTTAAAAGGG	pET30a$^+$
g. IF1 Δ1-16	CGACGACGACGACAAGTTTGTTAAAAGGGAAAG	pET30a$^+$
h. IF1 Δ1-17	CGACGACGACGACAAGGTTAAAAGGGAAAGGG	pET30a$^+$
i. IF1 F17S	GTCAGGCTCAGAGGATTCGTCTGTTAAAAGGGAAAG	pET30a$^+$

Tableau 3: **Séquences des oligonucléotides utilisés pour les différentes mutagenèse d'IF1**. IF1 F28W est le peptide considéré comme IF1 wT.

Les IF1 wT, tronqués et cystéiques. Les constructions d'IF1 wT, tronqués ou mutés ont un site de coupure à l'entérokinase entre la séquence codant l'extension N-ter $His_{(6)}$ et celle du peptide d'intérêt. Après 2 lavages successifs avec 10 mM imidazole tampon A et 20 mM imidazole tampon A, 30 U d'entérokinase sont ajoutés dans la colonne dans du tampon de coupure contenant 20 mM Tris, 50 mM NaCl ajusté à pH 7,4. Après 20 heures de batch à température ambiante, l'extension N-ter $His_{(6)}$ est dissociée de la protéine d'intérêt, et celle-ci est éluée dès les premières fractions.
Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées, chauffées à 90°C pendant 10 minutes, puis centrifugées dans une centrifugeuse de paillasse pendant 20 minutes à 10°C pour éliminer l'entérokinase. Les protéines contenues dans le surnageant sont ensuite précipitées avec du TCA (10 %). Après centrifugation, le culot est solubilisé dans 50 mM Na acétate, pH 5,5 et, enfin, les peptides solubilisés sont conservés à -20°C.

Les IF1 allongés. Après 2 lavages successifs avec 10 mM imidazole et 20 mM imidazole tampon A, les constructions d'IF1 fusion et PsaE-IF1 (Figure 18) ne sont pas coupées à l'entérokinase mais éluées à 250 mM imidazole tampon A. Les fractions contenant les peptides d'intérêt sont rassemblées puis dialysées pendant 7 heures, à 5°C, dans du tampon de dialyse contenant 50 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,8. Les protéines sont ensuite concentrées par Centricon Ultrafree®-0,5 Centrifugal Fliter Device (cutoff=5000) et conservées à -20°C.

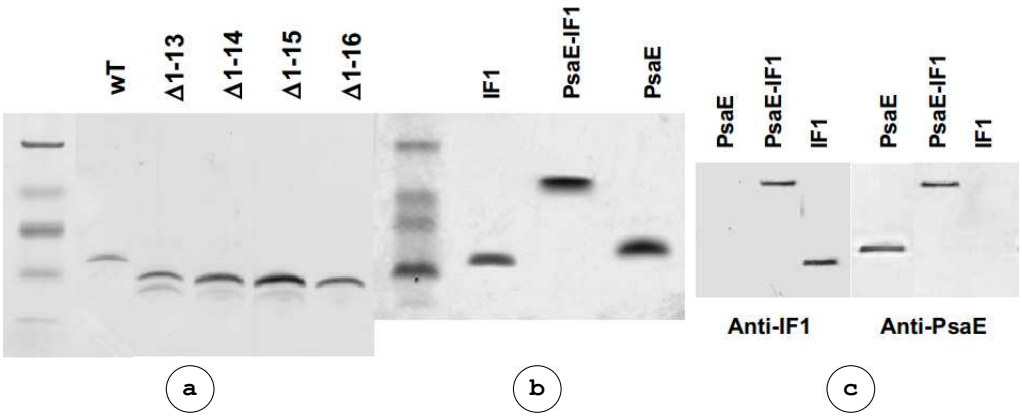


Figure 19: **Analyse des IF1 recombinants wT et modifiés en N-terminal par gel SDS-PAGE 12% et immunoblot.** 1μg de peptide d'IF1 est chargé dans chaque puits. Les protéines contenues dans les échantillons migrent par électrophorèse dans le gel de polyacrylamide 12% et les protéines sont révélées au bleu de Coomassie (Figure a et b) et par immunoblot (Figure c).

Dosage de protéines et électrophorèse SDS-PAGE

Les protéines sont dosées par micro-BCA, puis leur taille est vérifiée par électrophorèse en gel dénaturant 12% (Figure 19).

H MODIFICATION ET EXTRACTION DE L'ATP SYNTHASE ENTIÈRE ou ISOLÉE (F_1-ATPase)

Biologie Moléculaire

I Les outils

Souches de levures *S.cerevisiae* utilisées

Deux souches de levures ont été utilisées :

- les souches Euroscarf pour l'étude du rôle de la partie N-terminale d'IF1 dans l'inhibition de l'ATPase. Cependant, les souches euroscarf ΔATP_1 n'ayant jamais poussé sur des milieux contenant les bonnes auxotrophies, nous avons sérieusement remis en cause la déplétion du gène ATP1 au locus et nous avons finalement utilisé la souche W303.
- la souche W303 ΔATP_1, ΔATP_2 créée par David Mueller. Cette souche nous a été envoyés par Marie-France Giraud (CNRS Bordeaux). Les auxotrophies ont été vérifiées à l'aide de différents contrôles décrits dans la section II.

Souche *S.cerevisiae*	Phénotype	Sexe	Auxotrophie	Selection par antibiotique
1. Euroscarf BY4741	wT	mat a	$[met]^-$, $[his]^-$, $[leu]^-$, $[ura]^-$	G418
2. Euroscarf BY4741	ΔATP_2	mat a	$[met]^-$, $[his]^-$, $[leu]^-$, $[ura]^-$	G418
3. Euroscarf BY4741	ΔATP_1	mat α	$[lys]^-$, $[his]^-$, $[leu]^-$, $[ura]^-$	G418
4. Euroscarf BY4741	ΔATP_1	mat a	$[met]^-$, $[his]^-$, $[leu]^-$, $[ura]^-$	G418
5. W303	ΔATP_1, ΔATP_2	mat a	$[met]^-$, $[leu]^-$, $[ade]^-$, $[trp]^-$, $[his]^-$, $[ura]^-$	-

Tableau 4: **Souches de levures *S.cerevisiae***. Les souches sont décrites avec leur phénotype, sexe, auxotrophie et antibiotique de sélection

Les plasmides "vecteur navette" bactérie *E.coli*/levure *S.cerevisiae*

Pour pouvoir faire des mutations aisément, il est très utile d'avoir la possibilité de travailler sur deux organismes. Un organisme, *E.coli*, dans lequel il est facile de muter et produire en grande quantité le plasmide et notre organisme d'étude, *S. cerevisiae*, dans lequel la protéine modifiée sera produite puis étudiée. Il existe des plasmides dits "vecteurs navettes" capables d'être transformé dans l'un ou l'autre des organismes. Ces vecteurs possèdent une origine de réplication bactérienne ORI et une origine de réplication de levure ARS. Dans notre étude, les vecteurs de type pRSXXX ont été utilisés pour faire toutes les manipulations génétiques sur l'ATP synthase. Dans le Tableau 5 sont énumérés l'ensemble des gènes codant les différentes sous-unités de la F_1 ATPase de *S.cerevisiae* ainsi que les plasmides dans lesquels chacun d'eux a été cloné.

Historique d'ATP1 et d'ATP2 au laboratoire

Le gène *ATP2*, initialement inséré dans un plasmide pRS344, nous a été donné par le laboratoire de David Mueller. Vincent Corvest a cloné *ATP2* dans un plasmide centromérique, pRS313 puis a inséré par mutagenèse dirigée 10 Histidines en 5' du gène *ATP2* pour faciliter la purification de la partie soluble F_1 sur colonne Ni-NTA[87].
Il existe deux constructions pour le gène *ATP1* :

- Une construction dans laquelle le gène *ATP1* wT a été cloné dans un plasmide pRS316. La séquence de la construction a été vérifiée et de nombreuses mutations ponctuelles sont apparues dans la zone du terminateur, affectant la production de la sous-unité α.
- Une construction dans laquelle le gène *ATP1* wT a été cloné dans un plasmide pVC_2. La séquence de cette construction, gentiment faite par Vincent Corvest, a également été vérifiée par séquençage. La construction ne contenant pas de mutation pouvant affecter la production de la sous-unité α, nous l'avons utilisé pour effectuer l'ensemble des mutations sur la sous-unité α de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*.

Nom	Taille (pb)	Gène introduit	Marqueur de sélection
pRS316	4887	*ATP1*	$Amp^R/[Ura]^-$
pVC_2	5686	*ATP1*	$Amp^R/[Ura]^-$
pRS313	4967	*ATP2*	$Amp^R/[His]^-$

Tableau 5: **Plasmides "shuttle" levures *S.cerevisiae*/bactéries *E.coli***. PVC_2 a été construit par Vincent Corvest.

II Construction des mutants de F_1-α et de F_1-β

Les mutants d'ATP1

Plusieurs mutants de la sous-unité α ont été créés. Nous avons utilisé le plasmide pVC2-ATP1 pour effectuer un certains nombres de mutations. Trois types de mutants sont distingués dans cette étude :

- Les mutants d'α qui ont servi à traiter la spécificité d'interaction IF1-F_1ATPase (Figure 20
- Le mutant Δ193-200 qui a servi à étudier l'oligomérisation de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*
- Les mutants d'α qui ont servi à étudier le rôle de l'interaction α-γ dans l'inhibition de l'ATP synthase par IF1

Dans le Tableau 6 sont référencés tous les plasmides qui ont servi à faire ces mutations.

Les mutants d'ATP2 : les mutants de DELSEQD

Les mutants de la sous-unité β qui ont été créés pendant cette thèse sont les mutants de la boucle β-^{394}DELSEQD^{400}. La Figure 21 montre les alignements de séquence et les mutations qui ont été effectuées sur β-^{394}DELSEQD^{400}.

PCR de mutagenèse

Le principe de mutagenèse est identique à celui décrit dans la section I. Les oligonucléotides utilisés pour la création des différents mutants d'ATP1 et ATP2 sont décrits dans le Tableau 6.

Transformation des levures *S.cerevisiae*

Transformation des souches "euroscarf". Les caractéristiques de la souche euroscarf sont résumées dans le Tableau 4. La transformation de cette souche de levure ne s'est fait qu'avec le plasmide pRS313-$ATP2_{(His)10}$. Les contrôles nécessaires sont décrits dans le Tableau 7.

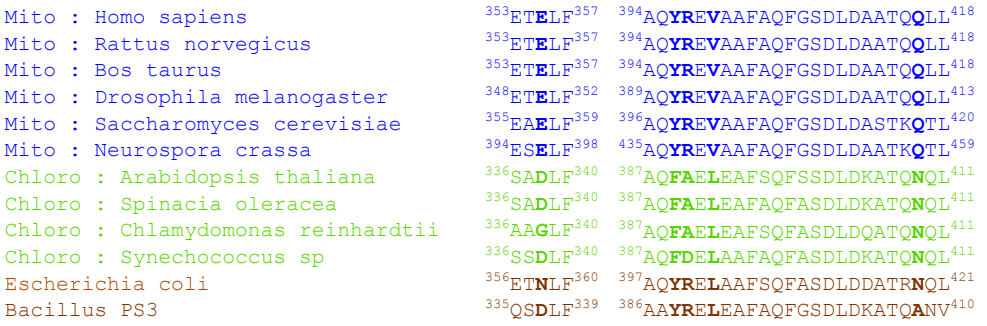
Transformation des souches W303. La souche W303 dont les caractéristiques sont décrites dans le Tableau 4 est transformée successivement par :

- le plasmide pRS313-$ATP2_{His(10)}$ wT ou muté
- le plasmide pVC_2-*ATP1*

Les cellules doublement transformées sont sélectionnées sur 30 mL de milieu minimum fermentescible sélectif et sur 30 mL de milieu respiratoire Ylac. Les contrôles nécessaires pour valider les simple et double transformations sont décrits dans le Tableau 8.

Biochimie

Les clones positifs poussent toute la nuit à 30˚C dans 10 mL de milieu respiratoire "Ylac" contenant 1% Yeast Extract, 0,1% KH_2PO_4, $SO_4(NH_4)_2$. Ces 10 mL sont ensuite dilués dans 50 mL du même milieu, puis dans 500mL. Une courbe de croissance est effectuée pour chacun des mutants.



(a)

(b)

(c)

Figure 20: **Description des mutants de la sous-unité α de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*.**

Mito : Homo sapiens	^{367}QKILQ**D**YK**S**LQ^{377}	^{356}EEAVAKA**D**KI**A**EE^{468}
Mito : Rattus norvegicus	^{379}QKILQ**D**YK**S**LQ^{389}	^{468}EEAVAKA**D**KI**A**EEHGS^{483}
Mito : Bos taurus	^{377}QKILQ**D**YK**S**LQ^{387}	^{466}EEAVAKA**D**KI**A**EEHS^{480}
Mito : Drosophila melanogaster	^{276}QKILQ**D**YK**S**LQ^{286}	^{365}EEVVAKA**D**RI**A**KEAA^{379}
Mito : Saccharomyces cerevisiae	^{375}QETLQ**T**YK**S**LQ^{385}	^{464}EDVVRKA**E**KI**A**REAN^{478}
Mito : Neurospora crassa	^{414}QQILQ**E**YK**S**LQ^{424}	^{503}ASARAKG**E**KI**L**AELEGQA^{520}
Chloro : Arabidopsis thaliana	^{392}KQTLQ**R**YK**E**LQ^{402}	^{481}DEATAKA**T**NI**E**MESKLKK^{498}
Chloro : Spinacia oleracea	^{392}KETLQ**R**YK**E**LQ^{402}	^{481}DEATAKA**M**NI**E**MESKLKK^{498}
Chloro : Chlamydomonas reinhardtii	^{392}KKTLQ**R**YK**E**LQ^{402}	^{481}TEAISKA**A**SI**K**^{491}
Chloro : Synechococcus sp	^{382}QSTLQ**R**YK**E**LQ^{392}	^{471}QEAIEKG**A**KI**K**AES^{484}
Escherichia coli	^{362}QSILQ**R**YQ**E**LQ^{372}	^{460}EEAVEKA**K**KI-^{473}
Bacillus PS3	^{371}QSILQ**R**YQ**E**LQ^{381}	^{451}EEVVEKA**K**AM**G**VEV^{460}

(a)

Chloro *A.thaliana*	^{402}QDIIAILGL**DELSEED**RLTVARARK^{426}
Bacillus PS3	^{381}QDIIAILGM**DELSDED**KLVVHRARR^{405}
E.coli	^{372}KDIIAILGM**DELSEED**KLVVARARK^{396}
mito *A.thaliana*	^{411}QDIIAILGM**DELSEDD**KLTVARARK^{435}
mito *H.sapiens*	^{377}QDIIAILGM**DELSEED**KLTVSRARK^{401}
mito *B.taurus*	^{386}QDIIAILGM**DELSEED**KLTVSRARK^{411}
mito *S.cerevisiae*	^{384}QDIIAILGM**DELSEQD**KLTVERARK^{409}
mutant DELSEQD 1	^{394}**G**ELSEQD^{400}
mutant DELSEQD 2	^{394}**DG**LSEQD^{400}
mutant DELSEQD 3	^{394}**DGGG**EQD^{400}
mutant DELSEQD 4	^{394}**DELSGQG**^{400}

(b)

Figure 21: **Description des mutants de la sous-unité β de l'ATP synthase de *S.cerevisiae*.**

Mutation	Séquence des oligonucléotides (5'→3')	Plasmides
Étude de l'interaction α-γ		
1. ATP1 ^{411}GLG^{413}	GCTTTTGCTCAATTCGGTTCCGGTTTAGGTGCCTCCACCAAGCAAACTTTG	PVC_2
2. ATP1 ^{411}GGG^{413}	GCTTTTGCTCAATTCGGTTCCGGTGGTGGTGCCTCCACCAAGCAAACTTTG	PVC_2
3. ATP1 ^{409}GGGGG^{413}	GCTCAATTCGGTGGCGGTGGTGGTG	PVC_2
4. ATP1 ^{411}GGGGGG^{416}	CGGTGGTGGTGGCGGCGGCAAGCAAACTTTGG	PVC_2
5. ATP1 ^{409}GGGGGGGG^{416}	OLIGO ATP1 5G + ATP1 6G	PVC_2
6. ATP1 D411G	GCTCAATTCGGTTCCGATTTAGGTGCCTCC	PVC_2
7. ATP1 D413G	CGGTTCCGGTTTAGATGCCTCCACCAAGC	PVC_2
8. ATP1 ^{409}GS___AST^{416}	GCTTTTGCTCAATTCGGTTCCGCCTCCACCAAGCAAACTTTGG	PVC_2
9. ATP1 ^{409}G_____ST^{416}	GCTTTTGCTCAATTCGGTTCCACCAAGCAAACTTTGGTTAGAGG	PVC_2
Étude de l'interaction β-γ		
10. ^{394}GELSEQD^{400}	GCTATTTTGGGTATGGGTGAATTGTCCGAACAAG	PRS313
11. ^{394}DGLSEQD^{400}	GGGTATGGATGGATTGTCCGAAC	PRS313
12. ^{394}DGGGEQD^{400}	GCTATTTTGGGTATGGATGGAGGGGGCGAACAAGATAAACTAACTGTCG	PRS313
13. ^{394}DELSGQG^{400}	GGTATGGATGAATTGTCCGGACAAGGTAAACTAACTGTCGAAAGGGC	PRS313
Étude de la spécificité d'interaction IF1/F_1-ATPases mitochondriales		
a. ATP1 E357D	GGTCAAATATTCTTGGAAGCTGACTTATTCTACAAGGG	PVC_2
b. ATP1 Q418N	GCCTCCACCAAGAACACTTTGGTTAGAGG	PVC_2
c. ATP1 Y399F, R400A, V402L	GAAATTGTTTTTGGCTCAATTCGCTGAATTGGCTGCTTTTGCTCAATTCGG	PVC_2
d. ATP1 E357D, Y399F, R400A, V402L, Q418N	OLIGO ATP1 E357D + OLIGO Q418N	PVC_2

Tableau 6: **Séquences des oligonucléotides utilisés pour les différentes mutagenèses d'ATP1**. Le gène ATP1 a eté introduit par clonage. Les mutants ponctuels présentés ici ont été produits par mutagenèse dirigée.

III Préparation de mitochondries et contrôles respiratoires

Les cellules sont récoltées en phase exponentielle. Pour chaque mutant, une courbe de croissance a donc été effectuée et les temps de génération pour chacun des mutants sont reportés dans le Tableau 9. Après une série de lavages, la paroi des levures est digérée par la zymolyase 20T (Seikagaku) et la membrane est rompue par choc osmotique. Les mitochondries sont purifiées par une série de centrifugations différentielles [23] et congelées directement dans l'azote liquide sous forme de billes à l'aide d'une seringue de 0,45mm de diamètre.

Un contrôle respiratoire est effectué le jour même pour vérifier l'intégrité de la membrane interne mitochondriale. Voir enregistrement type, Figure 22.

IV Préparation de SMP (particules submitochondriales)

Les mitochondries fraîches ou décongelées sont diluées 10 à 20 fois dans du tampon Tris(SO_4) 20 mM, EDTA 200μM pH 8,5, puis soniquées à 20W (sonicator cell disruptor, output control 2) dans un bain d'eau glacé, 3x30 secondes ou 2x15sec + 1x20sec pour certains mutants instables (ATP1Δ(SDLDA) et ATP1 D-FAL-N). Après sonication, les SMP peuvent être utilisées directement pour les mesures enzymatiques. Elles peuvent être aussi centrifugées pendant 20 minutes à 23 000 g pour éliminer les fractions contaminantes membranaires, puis pendant 40 minutes à 4°C à 100 000

Transformations ΔATP1 +ATP1 ou ΔATP2 + ATP2			
N°	**Milieu**	**Crible**	**Résultat**
1.	Ylac	$[Resp]^+$	+
2.	SD + met + leu + his/ura	$[ura]^+/[his]^+$	+
3.	YPD	[souche] ok	+
4.	SD + met + leu + his + ura	$[Auxo]^-$	+
5.	Ylac	$[Resp]^+$	-
6.	SD + met + leu + his/ura	$[ura]^-/[his]^-$	-

Tableau 7: **Transformation des levures *S.cerevisiae* euroscarf**

Transfo 1ΔATP1, ΔATP2 +ATP1 ou +ATP2			Transfo 2ΔATP1 ou ΔATP2 +ATP2 ou +ATP1		
N°Milieu	**Crible**	**Résultat**	**Milieu**	**Crible**	**Résultat**
1. Ylac	$[resp]^-$	-	Ylac	$[resp]^+$	+
2. SD + met + leu + ade + trp + his/ura	$[ura]^-/[his]^-$	+	SD + met + leu + ade + trp	$[ura]^+$, $[his]^+$	+
3. YPD	$[Souche]^+$	+	YPD	$[Souche]^+$	+
4. SD + met + leu + ade + trp + his + ura	$[Auxo]^-$	+	SD + met + leu + ade + trp + his + ura	$[Auxo]^-$	+
5. Ylac	$[resp]^-$	-	Ylac	$[resp]^-$	-
6. SD + met + leu + ade + trp + his	$[ura]^-$	-	SD + met + leu + ade + trp + his/ura	$[ura]^+/[his]^+$	+
7. SD + met + leu + ade + trp + ura	$[his]^-$	-	SD + met + leu + ade + trp	$[ura]^-$, $[his]^-$	-

Tableau 8: **Transformation des levures *S.cerevisiae* W303 Δ*ATP1*, Δ*ATP2***

g pour éliminer les contaminants solubles [88].

V Préparation de F_1 isolé

Les levures sont récoltées en phase exponentielle de croissance, puis broyées avec des billes de verre de 0,5 mm de diamètre en présence d'inhibiteurs de protéases (PMSF). Par centrifugations différentielles, une fraction brute mitochondriale est récupérée puis soumise à un choc osmotique afin d'obtenir des mitoplastes. Ceux-ci sont soniqués et génèrent des particules submitochondriales (SMP) qui sont traitées au chloroforme pour solubiliser les membranes et libérer les F_1-ATPases. Les F_1-ATPases contenant une sous-unité β-$His_{(10)}$ peuvent être purifiées sur colonne Ni-NTA[87]. Les fractions récoltées sont ensuite dialysées dans du tampon de dialyse (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 2 mM) pH 7,4, précipitées au sulfate d'ammonium (70%) et conservées à 4°C [89][90].

VI Dosage de protéines

Les mitochondries ont été diluées 10 à 30 fois dans du SDS 5%, puis les protéines mitochondriales ont été dosées par micro-BCA en utilisant le kit "micro BCA protein assay". Le dosage de la partie F_1 soluble a également été faite par micro BCA.

		Collision α-γ		Collision β-γ		Spécificité IF1-F_1	
wT	3h	GLG	4h40	GELSEQD	4h30	E357D	n.d
Δ193-200	4h30	3G	3h40	DGLSEQD	3h20	Q418N	n.d
		5G	7h15	DGGGEQD	3h10	FAL	4H10
		6G	4h10	DELSGQG	3h	D-FAL-N	3H50
		8G	4h				
		D411G	3h25				
		D413G	2h50				
		Δ(DLD)	5h15				
		Δ(SDLDA)	7h15				

Tableau 9: **Temps de génération des levures *S.cerevisiae* wT et mutantes**

I Études structurales et expériences fonctionnelles

I Etude de l'oligomérisation d'IF1 par spin labeling et visualisation par spectroscopie RPE

La spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) est une technique qui permet de détecter les électrons non appariés dans les couches électroniques (espèce paramagnétique). Elle est basée sur l'observation d'une énergie absorbée par un système paramagnétique dans un champ magnétique.

II Marquage des peptides et détermination du taux de marquage

Marquage des peptides IF1 cystéiques avec le marqueur de spin MTSL

Des cystéines ont été introduites à des positions stratégiques dans le peptide IF1 (Figure 17) pour pouvoir y greffer un marqueur de spin. Tout d'abord, les cystéines doivent être réduite pour qu'un pont disulfure puisse se créer entre le peptide et le marqueur de spin. Pour la réduction des cystéines, l'ensemble des tampons utilisés est dégazé sous argon. 5mM de TCEP sont dissous dans 50 mM de tampon MES pH 6,5 et réagissent avec x μM d'IF1 pendant 40 minutes sous flux d'argon. Le TCEP est ensuite éliminé par passage du peptide dans une colonne PD10-G25. Après récolte des échantillons contenant la protéine (absorbance 280 nm), le marqueur est ajouté (10x) et la réaction de marquage de la protéine avec le marqueur de spin (MTSL) se fait ensuite pendant 40 min dans un bain de glace. Suite au marquage, l'excès de MTSL doit être éliminé par passage de l'échantillon contenant la protéine dans une colonne PD10-G25. Les échantillons contenant la protéine sont ensuite soumis à des mesures RPE.

Détermination du taux de marquage

La détermination du taux de marquage se fait par acquisition d'un spectre RPE. La formule permettant de calculer le taux de marquage est la suivante :

$$C_{spin} = C_s \frac{I}{I_s} \frac{MA_s}{MA} \sqrt{\frac{P_S}{P}} \frac{g_s}{g} \frac{Na_s}{Na} \frac{RG_s}{RG} \frac{SW^2}{SW_s{}^2} \quad (1)$$

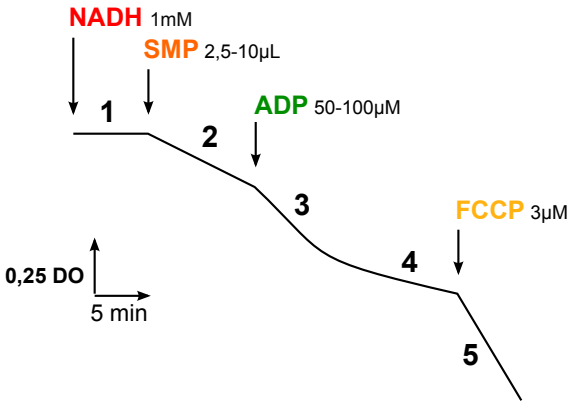


Figure 22: **Contrôle respiratoire**. Dans la cuve de mesure (0,4 cm de trajet optique) contenant (tampon milieu respiratoire), 1mM de NADH est ajouté (**1**), puis l'ajout de SMP déclenche la disparition du NADH à 340 nm par la respiration mitochondriale (**2**). Après ajout d'ADP, la consommation en NADH s'accroît, la chaîne de transfert d'électrons s'accélère pour que l'ADP ajouté soit transformé en ATP. (**3**) correspond à l'état 3. Après consommation de l'ADP, les mitochondries reviennent à leur état respiratoire basal correspondant à l'état4 (**4**). Enfin, l'ajout de FCCP découple la membrane et fait chuter le gradient de protons. La consommation en NADH chute brutalement.

où :

MA est l'amplitude de modulation

Na est le nombre d'accumulation

RG est le gain

G est le facteur g

I est la valeur de double intégration

SW est la largeur de gamme de champ

Spectroscopie RPE

Ici, nous n'allons pas décrire le principe de la RPE ni les paramètres de mesure qui ont été utilisés pour faire ces expériences car cette partie a été faite en collaboration avec Marlène Martinho et Valérie Belle du Laboratoire de Bioénergétique et Bioingénierie des protéines (BIP, CNRS Marseille)

J Mesures de l'hydrolyse d'ATP, Cinétique d'inhibition, Étude enzyme-Substrat

I Mesure d'hydrolyse d'ATP

L'hydrolyse d'ATP de la F_1-ATPase ou des SMP (F_0F_1-ATPase) a été mesurée, en présence d'un système régénérant (Figure 23), en suivant la disparition du NADH au cours du temps à 340 nm.

Cette réaction se produit dans une cuve thermostatée (25°C) dans laquelle le milieu réactionnel pH6,5 (50 mM MES, 20 mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 0,4mM NADH, 1 mM PEP, 20 unités/mL de Pyruvate Kinase et 50 unités/mL de Lactate Déshydrogenase) est agité. Dans le cas de la mesure d'hydrolyse d'ATP par les SMP, la cuve contient également 3μM antimycine et 3μM FCCP.

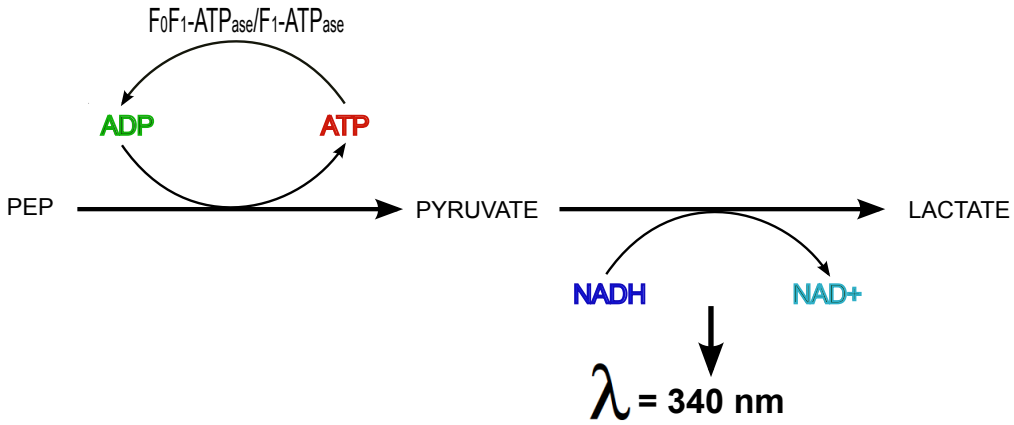


Figure 23: **Mesure d'hydrolyse d'ATP**

II Cinétique d'inhibition et traitement des données

Après 2 à 4 minutes d'enregistrement, IF1 est injecté dans la cuve de mesure dans une gamme de concentration de 15 nM à 2μM et l'activité ATPasique décroît (Figure 24). Les enregistrements sont analysés et ajustés avec une fonction monoexponentielle (Equation 2) décroissante correspondant au déclin de l'activité ATPasique. (Figure 24)

$$y(t) = V_\infty(t) + (\frac{V_0 - V_\infty}{k_{app}})(1 - e^{-k_{app}t}) + y_0 \tag{2}$$

y(t) représente l'absorbance au temps t.

$\mathbf{y}_0$ représente l'absorbance au temps 0, lors de l'injection d'IF1.

$\mathbf{V}_{(0)}$ représente la vitesse initiale d'hydrolyse d'ATP avant injection d'IF1.

$\mathbf{V}_{(\infty)}$ représente la vitesse finale après ajout d'IF1.

$\mathbf{k}_{app}$ représente la constante de vitesse apparente d'inhibition.

En reportant les valeurs de k_{app} obtenues en fonction de la concentration en IF1, on détermine la constante de vitesse de formation (k_{on}) et la constante de vitesse de dissociation (k_{off}) du complexe inhibé F_1ATPase/IF1. (Équation 3)

$$k_{app} = k_{on}[I] + k_{off} \tag{3}$$

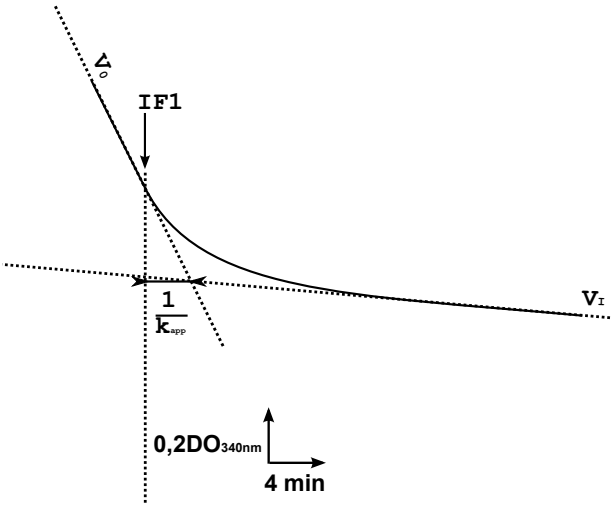


Figure 24: **Enregistrement type de cinétique d'inhibition**.

$\frac{V_\infty}{V_0}$ et la concentration en IF1 sont liés selon l'équation suivante :

$$\frac{V_\infty}{V_0} = v_r + \frac{1 - v_r}{(1 + \frac{[I]}{K_i})} \tag{4}$$

v_r est la fraction de V_0 insensible à l'inhibition de d'IF1.

K_i devrait être égal au rapport $\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$

Dans toutes les expériences effectuées :

- nous avons utilisé le modèle simplifié où $E + I \leftrightharpoons EI$
- la concentration en IF1 est largement supérieure à celle de l'enzyme ; la concentration totale et libre en inhibiteur peut donc être considérée comme constante lors des mesures de cinétiques d'inhibition.

Ces approximations justifient l'utilisation de l'expression monoexponentielle donnée par l'Équation 2 et l'expression hyperbolique donnée par l'Équation 4 pour le traitement des données.

III Étude enzyme-Substrat et traitement des données

Les mesures d'hydrolyse d'ATP en fonction de la concentration croissante en MgATP (2μM-4mM) ont été réalisées avec le système régénérant décrit dans la Figure 23, p 57. En absence de MgATP, on observe une faible pente d'hydrolyse d'ATP qui correspond à la présence de nucléotides contaminants dans les solutions du système régénérant et dans les SMP. Les courbes obtenues sont

ajustées grâce à l'expression hyperbolique suivante :

$$v = \frac{V_m \text{ x } [S]}{K_M + [S]} \tag{5}$$

Pour appliquer l'Equation 5, 2 approximations sont nécessaires :

- la concentration en enzyme (quelques nM) est très inférieure par rapport à la concentration en substrat (5μM - 4mM)
- La réaction simple ci-dessous doit avoir atteint l'état stationnaire

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

.

Troisième partie

RÉSULTATS

Chapitre 1

Étude de l'oligomérisation d'IF1 par marquage de spin et visualisation par spectroscopie RPE

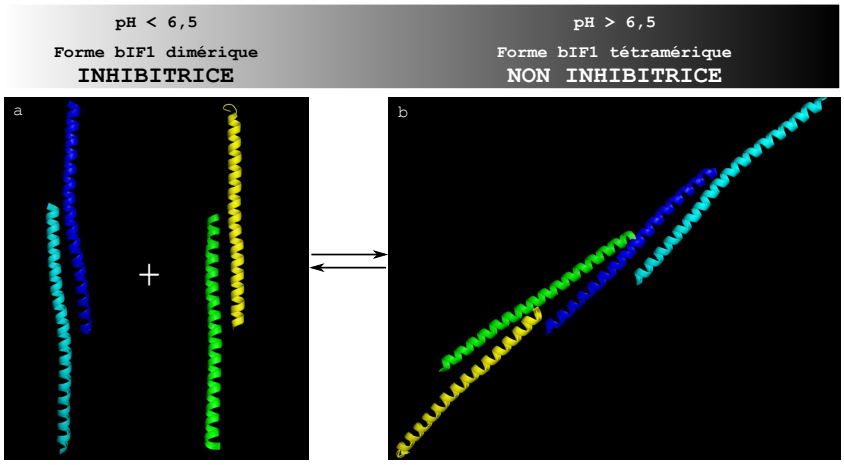
A Description biochimique d'IF1 et mise en évidence des différentes formes d'IF1 chez *B.taurus* et *S.cerevisiae*

La technique de centrifugation analytique [67][73] ainsi que les expériences de pontage par le dimethyl suberimidate ont permis de mettre en évidence différentes formes oligomériques du peptide IF1 chez *B.taurus* et chez *S.cerevisiae*. Un équilibre dimère-tétramère a été identifié chez *B.taurus* et un équilibre monomère-dimère l'a été chez *S.cerevisiae*. De ces expériences ont pu être déduites des constantes de dissociation monomère-dimère chez *S.cerevisiae* à différents pH dont les valeurs sont reportées dans le Tableau 1.1. Ces données seront mentionnées dans la section I "Mise au point du marquage".

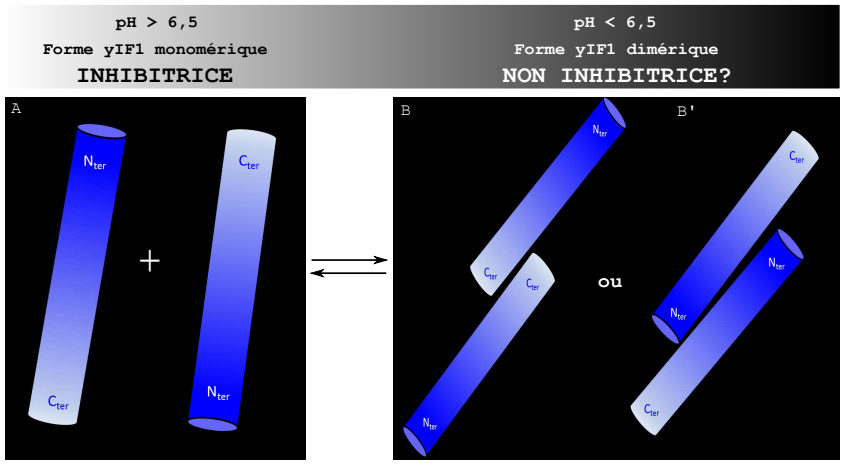
	K_d IF1 *S.cerevisiae* (μM)
pH 5,0	1,2
pH 6,5	6,0
pH 8,0	9,1

Tableau 1.1: **Constantes de disssociation K_d mesurées par centrifugation analytique à différents pH pour l'IF1 de *S.cerevisiae* [73].**

La formation des oligomères chez *B.taurus* et *S. cerevisiae* dépend du pH. Chez *B.taurus*, la forme dimérique prédomine à des pH inférieurs à 6,5 et la forme tétramérique à des pH supérieurs à 6,5. Il n'existe pas de forme monomérique chez le bovin. Chez *S.cerevisiae*, la forme monomérique est majoritaire lorsque le pH est supérieur à 6,5 alors que la forme dimérique est prédominante lorsque le pH est inférieur 6,5. Ces formes d'IF1 possèdent un caractère inhibiteur différent. Chez *B.taurus*, la forme dimérique est inhibitrice et la forme tétramérique ne l'est pas (Figure 1.1). Chez *S. cerevisiae*, nous savons que la forme monomérique inhibe, en revanche aucune donnée ne nous permet de conclure quant au caractère inhibiteur ou non de la forme dimérique (Figure 1.1).



(a) Équilibre dimère/tétramère d'IF1 chez *B.taurus*



(b) Équilibre monomère/dimère d'IF1 chez *S.cerevisiae*

Figure 1.1: **Formation des oligomères d'IF1 en fonction du pH chez *B.taurus* et *S.cerevisiae*.** (a) Les 2 dimères de bIF1 (pdb : **1GMJ**) sont en équilibre avec le tétramère de bIF1. A pH acide la forme dimérique est prédominante et à pH basique la forme tétramérique est prédominante. (b) Les monomères d'IF1 de *S.cerevisiae*(yIF1 sont représentés par des bâtonnets. Les monomères, inhibiteurs sont majoritaires lorsque le pH est inférieur à 6,5 et les dimères sont prédominants lorsque le pH est supérieur à 6,5. Le caractère inhibiteur ou non du dimère d'IF1 de *S.cerevisiae* n'a pour l'instant pas été démontré. Ne connaissant pas la région de dimérisation d'IF1, nous avons envisagé deux possibilités : une dimérisation par la partie C-terminale ou par la région médiane.

B Description structurale d'IF1 : l'IF1 de *B.taurus*

Description du monomère d'IF1. L'IF1 bovin (1-84) est majoritairement structuré en hélice α [26]. La région N-terminale du peptide n'est pas très conservée et semble stabiliser le complexe IF1-MF1 dans l'étape finale du mécanisme d'inhibition de l'ATPase par IF1 [91][92], voir Chapitre 4. La séquence médiane du peptide est très conservée et constitue la partie inhibitrice du peptide. La région 14-47 du peptide bovin a pu être identifiée, par des expériences de mutagenèse dirigée couplées à des expériences d'inhibition de l'activité ATPasique, comme étant la séquence minimale inhibitrice [66]. Enfin, la partie C-terminale ne semble pas être impliquée dans le caractère inhibiteur du peptide mais plutôt dans des changements structuraux qui induisent la dimérisation du peptide bovin [67].

Identification des régions impliquées dans l'oligomérisation de l'IF1 bovin. Comme on l'a vu dans la section précédente, le peptide bovin n'existe pas sous forme monomérique mais sous forme d'un dimère et d'un tétramère en équilibre dont les proportions dépendent du pH. Différents mutants délétés progressivement en N- ou C-terminal ont été créés et leur capacité à dimériser ou à tétramériser à différents pH a été évaluée par centrifugation analytique [67][69]. Depuis, la structure cristallographique du tétramère bovin a permis de visualiser les zones d'interaction. Cette expérience a permis de définir très précisément deux régions :

- La région C-terminal 44-84, selon les données biochimiques [67], et 49-78 selon les données cristallographiques [26], est impliquée dans la dimérisation du peptide. On parlera dans ce cas d'interface **intra-dimère** ou **interface D**.
- La région médiane 32-43, selon les données biochimiques, 24-52 selon les données cristallographiques, est confondue à la séquence minimale inhibitrice 14-47 [66] et est impliquée dans la tétramérisation du peptide ou dimérisation de deux dimères d'IF1. On parlera alors de l'interface **inter-dimère** ou **interface T**

Ces 2 dénominations sont importantes car elles seront utilisées par la suite pour définir les régions homologues à ces deux régions qui définissent les deux interfaces les plus probables de dimérisation de l'IF1 de levure. Les hélices α des monomères d'IF1 sont orientées de façon antiparallèle dans le dimère ou dans le tétramère [69](pdb :1GMJ). Cependant les deux interfaces ne sont pas équivalentes :

- L'interface intra-dimère (D) est symétrique ce qui signifie que les résidus impliqués dans la dimérisation du peptide se font face et sont identiques pour les deux hélices.
- L'interface inter-dimère (T) est, elle, asymétrique, ce qui signifie que les résidus impliqués dans la tétramérisation du peptide et qui se font face ne sont pas identiques.

Une histoire de protonation pour la dimérisation d'IF1... La formation de dimère ou de tétramère semble dépendre strictement du pH. Les histidines situées en C-terminal et particulièrement l'histidine 49 semblent jouer un rôle dans l'oligomérisation du peptide [67] [69][93]. Une fois ces résidus protonés, la structure de l'hélice se modifierait dans la région 37-45. Ce changement de conformation favoriserait la formation de structure coiled-coil et induirait ainsi la tétramérisation du peptide. La mutation de l'histidine 49 rendrait le peptide insensible aux différences de pH [69][93] et ne permettrait donc pas le changement structural de l'hélice, et la formation de tétramères d'IF1 deviendrait alors plus difficile.

C L'IF1 de *S.cerevisiae*

Chez *S.cerevisiae*, il existe 2 peptides, IF1 et Stf1p qui semblent avoir des mêmes fonctions inhibitrices [76][74][94] [95] mais leur rôle dans l'inhibition reste encore assez obscure. Seule l'étude d'IF1 a été abordée ici. La structure du peptide IF1 chez *S.cerevisiae* n'a pas encore été résolue. Les données biochimiques ont pu mettre en évidence quelques propriétés inhibitrices de l'IF1 monomérique [73]. Dans ce Chapitre, nous aborderons l'étude de l'oligomérisation du peptide IF1 de levure en utilisant comme référence les données biochimiques et le modèle structural d'IF1 obtenu par radiocristallographie chez *B.taurus*. En se basant sur l'homologie de séquence qui existe entre les peptides bovin et de levure, nous pouvons émettre l'hypothèse que s'il existe un dimère d'IF1 chez *S.cerevisiae*, il pourrait se former par

- l'interface **intra-dimère D**, Figure 1.2 décrit chez le bovin dans la section B
- l'interface **inter-dimère T**, Figure 1.2 décrit chez le bovin dans la section B

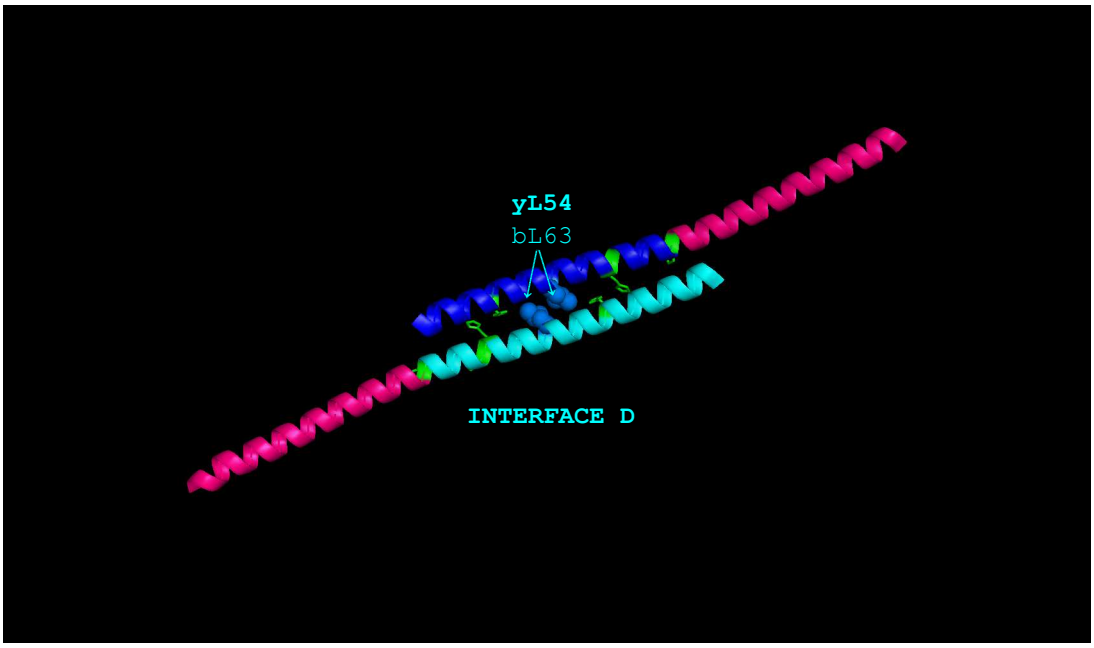
Pour répondre à ces deux hypothèses, nous avons décidé d'utiliser la technique de Site-Directed Spin Labeling (SDSL) ou marquage de spin associé à de la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique (RPE).

D L'outil : Le marquage de spin et la spectroscopie RPE

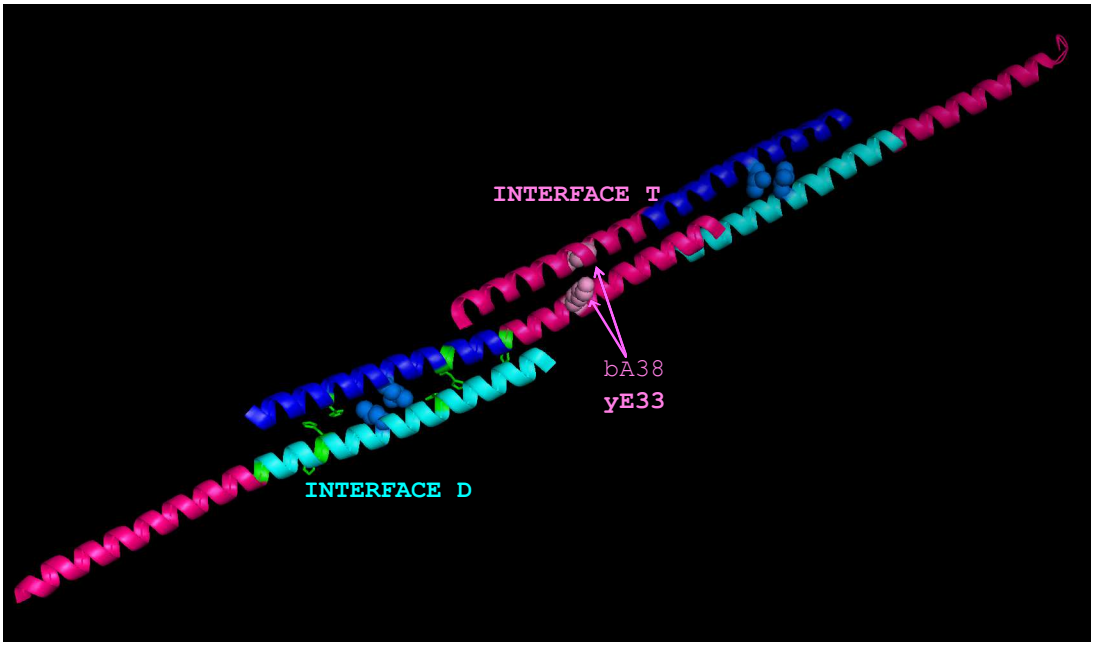
Ce travail a été fait en étroite collaboration avec Marlène Martinho et Valérie Belle du laboratoire de Bioénergétique et BioIngénierie des Protéines (BIP, UPR 9036) du CNRS de Marseille. Les résultats présentés sont encore au stade exploratoire et certaines expériences nécessitent quelques améliorations mais ces premiers pas semblent encourageants.

I Principe de la technique de marquage de spin associée à la spectroscopie RPE

La technique de spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique ne sera pas détaillée ici mais décrite brièvement pour la compréhension des expériences qui vont suivre. La spectroscopie RPE permet de mettre en évidence des espèces paramagnétiques qui ont des électrons non appariés dans les couches électroniques. Ces espèces comprennent les métaux de transition comme (Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, etc...) et les espèces radicalaires. Elle est basée sur l'observation d'une énergie absorbée par un système paramagnétique dans un champ magnétique. C'est un outil puissant permettant de visualiser les interactions inter- et intra-moléculaires et d'obtenir des informations structurales complémentaires à celles obtenues par cristallographie aux rayons X. Le marquage de spin ou Site-Directed Spin Labeling (SDSL) consiste à insérer une espèce paramagnétique ou marqueur de spin au sein d'une protéine. On comprend donc bien que si on insère une espèce paramagnétique au sein d'une protéine naturellement dépourvue de centre paramagnétique, on va pouvoir obtenir des informations d'ordre structural (distances) et dynamique (interactions moléculaires, repliement, changements structuraux, etc...). De nombreuses sondes paramagnétiques peuvent être utilisées pour cette étude, mais les plus communément utilisées sont celles issues de la famille des nitroxides. L'incorporation d'un composé nitroxide au sein d'une protéine nécessite la présence d'un site cystéique au sein de la protéine d'intérêt pour pouvoir créer une liaison covalente entre le marqueur et la protéine (Figure1.3). Les cystéines peuvent être présentes naturellement dans la protéine ou peuvent être introduites par mutagenèse dirigée. Après marquage de la protéine (Figure 1.3), un certain nombre de tests est nécessaire pour pouvoir interpréter les données obtenues par spectroscopie RPE :



(a) Interface D inter-dimère



(b) Interface T intra-dimère

Figure 1.2: **Description du tétramère d'IF1 bovin**.(pdb :**1GMJ**)[69](a) Représentation d'un dimère d'IF1 avec en bleu l'interface intra-dimère. Le résidu L63 est représenté en boule bleue. Son correspondant chez *S.cerevisiae* est le L54. (b) Représentation du tétramère d'IF1 avec en bleu l'interface intra-dimère et en rose l'interface inter-dimère. L'hélice colorée en rose représente la région inhibitrice minimale de l'IF1 bovin. Le résidu A38 est représenté en boule rose. Son correspondant chez *S.cerevisiae* est le E33.

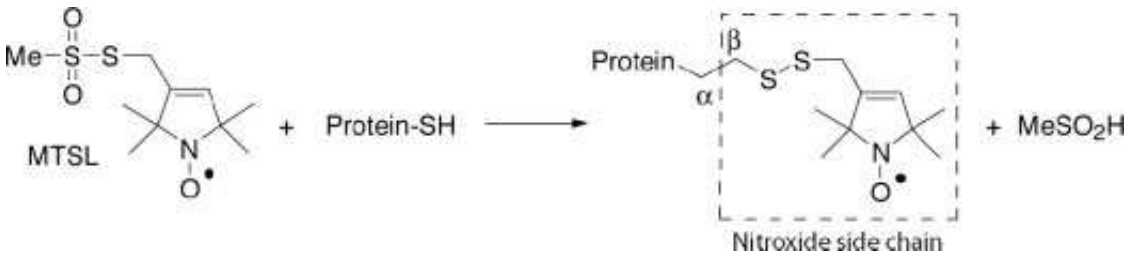


Figure 1.3: Équation chimique de la réaction du MTSL avec le site cystéique d'une protéine

1. les protéines marquées sont soumises à des études de dichroïsme circulaire (CD) pour vérifier que la mutation et le marquage n'ont pas modifié la structure de la protéine
2. Des études fonctionnelles sont également nécessaires pour vérifier l'intégrité de la fonction de la protéine
3. Le pourcentage de protéines marquées par le MTSL doit être calculé pour l'interprétation des spectres RPE

II Application de la technique de marquage de spin à l'étude de l'oligomérisation d'IF1

La technique de marquage de spin associée à la spectroscopie RPE permet non seulement d'évaluer la mobilité du composé nitroxide au sein des chaînes latérales et donc de déduire l'environnement stérique de celui-ci, mais elle permet aussi d'estimer des distances intra- et inter-moléculaire en utilisant un outil de RPE pulsée dit Double Electron Electron Resonance (DEER). Dans notre cas, nous avons greffé un composé nitroxide nommé 1-oxyl-2,2,5,5-tétraméthyl-δ^3-pyrroline-3-méthyl-méthanethiosulfonate (MTSL) à différentes positions stratégiques dans l'hélice α du peptide IF1 de levure. L'insertion du marqueur au sein de la protéine nécessite la présence de cystéines sur le peptide de façon à ce que le MTSL puisse se greffer covalemment sur IF1 (Figure 1.3). Quelques mutants cystéiques ont donc été créés et produits dans le système hétérologue bactérien *E.coli*. Le protocole de génération des mutants cystéiques et leur description sont détaillés dans le Matériels et Méthodes. 5 mutants ont été produits :

- IF1 E33C
- IF1 L54C
- IF1 E21A-E33C
- IF1 E21A-L54C
- IF1 H39C

E Les mutants cystéiques, une histoire de longue date qui se poursuit

I Historique des mutants cystéiques au laboratoire

Au laboratoire, une étude sur l'oligomérisation du peptide avait déjà été initiée par Elena Bisetto. J'ai ensuite repris cette étude pendant mon stage de Master. Le but de cette étude était double :

- Le première était d'attribuer un caractère inhibiteur ou non inhibiteur aux deux formes monomériques et dimériques présentes chez la levure
- Le deuxième était d'identifier la zone de dimérisation du peptide

Sur la base de la forte homologie existante entre l'IF1 bovin et l'IF1 de levure, des cystéines ont été placées à des endroits stratégiques le long de l'hélice α du peptide. L'hypothèse de travail étant que s'il existe des dimères d'IF1 naturels, la formation de ponts disulfure intermoléculaire devrait être favorisée si les cystéines introduites se font face dans le dimère naturel. Les interfaces d'oligomérisation du peptide bovin décrites ci-dessus dans la section B nous permettent d'émettre l'hypothèse que s'il existe un dimère d'IF1 de levure, il se formerait soit par l'interface D, soit par l'interface T. Deux mutants ont donc été créés pour pouvoir confirmer l'une ou l'autre hypothèse.

- L'yIF1 L54C homologue du résidu L63 chez *B.taurus* pour l'interface D
- L'yIF1 E33C homogue du résidu A38 chez *B.taurus* pour l'interface T

Des expériences d'oxydo-réduction (1m $CuCl_2$ 1mM pH 6,0 ou 4 mM de DTT à pH 8,0) ont été réalisées pour les différents mutants. La formation et la rupture des dimères ou oligomères artificiels ont été contrôlées par SDS-PAGE. L'évolution dans le temps des propriétés inhibitrices des mutants en condition oxydante ou réductrice a été suivie en injectant une concentration donnée d'IF1 dans la cuve de mesure contenant la partie soluble de l'ATPaseF_1-ATPase. Cette étude avait montré que le monomère était inhibiteur et que les différents dimères artificiels pontés en C-terminal l'étaient aussi. En revanche les dimères inhibiteurs pontés en N-terminal n'étaient pas inhibiteurs. Aucune interface de dimérisation n'avait donc pu être déduite clairement de cette étude.

II Justification du choix des mutants cystéiques

Les IF1 E33C et IF1 L54C ont donc été réutilisés pour étudier l'oligomérisation du peptide par l'une ou l'autre des interfaces avec la technique de marquage de spin couplée à la spectroscopie RPE. Ce sont les deux mutants dont les spectres ont été analysés pour l'instant. Les mutants qui vont suivre ont été produits mais attendent d'être analysés.

- La mutation E21A a ensuite été ajoutée sur le mutant IF1 E33C et sur le peptide IF1 L54C pour former les doubles mutants IF1 E21A-E33C et IF1 E21A-L54C. Une étude précédente a montré que la mutation du résidu E21 en Alanine provoquait la perte de sensibilité du peptide au pH [96]. Si le changement de pH est, comme pour le résidu H49 chez *B.taurus*, responsable d'un changement de conformation de l'hélice qui induirait la dimérisation du peptide, on peut s'attendre à ce que le résidu E21 ait les mêmes propriétés. En mutant ce résidu, on s'attendrait à avoir un effet serait à celui du mutant H49K à savoir une perte de la sensibilité au pH et une absence de formation du dimère d'IF1.
- L'IF1 H39C a été créé pour pouvoir faire des mesures de distances (DEER) entre des marqueurs sur deux monomères d'IF1. Les expériences de Double Electron Electron Resonance ou DEER peuvent estimer des distances dans une gamme comprise entre 20 Å et 60 Å. Le choix de ce mutant a été délicat car sa position devait être telle qu'on obtienne une distance comprise entre 20 Å et 60 Å. Le mutant H39C a été choisi sur la base de la structure du tétramère bovin dans laquelle l'alanine 44 est l'homologue bovin. D'autre part, il est important que sa mutation n'entraîne aucune perturbation dans le pouvoir inhibiteur. La Figure 1.4 montre les distances entre deux A44C marqués dans le cas où l'une ou l'autre forme oligomérique se formerait. Si la distance mesurée est proche de 20 Å, alors le dimère d'IF1 se formera par l'interface T. Si la distance mesurée est proche de 60 Å, alors le dimère d'IF1 de levure se formera par l'interface D.

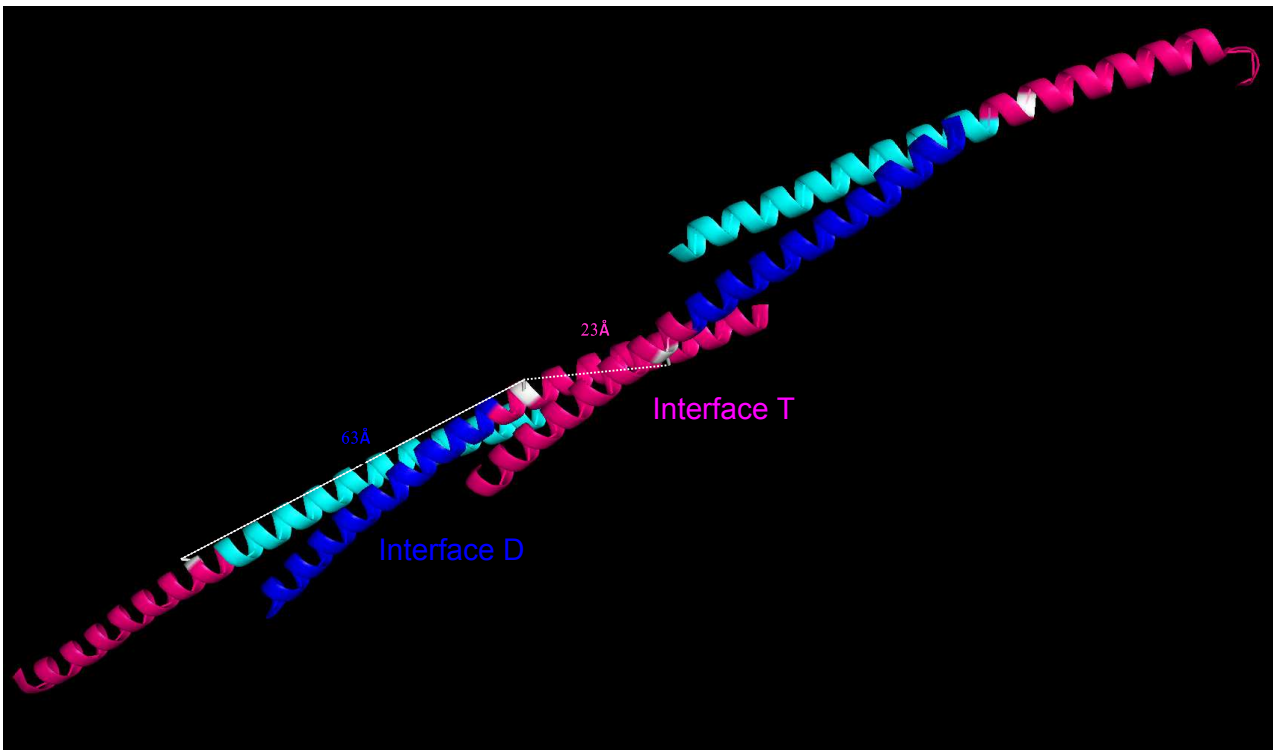


Figure 1.4: **Mesure de distance entre les résidus A44, homologues à l'histidine H39 chez *S.cerevisiae*, dans l'interface D et dans l'interface T.** En blanc, l'alanine 44. Dans l'interface T, la distance entre les alanines de deux monomères d'IF1 est de 23 Å. Dans l'interface D, la distance entre les alanines de deux monomères d'IF1 est de 61 Å.

F Résultats obtenus sur les IF1 E33C et IF1 L54C

Seules les données des mutants IF1 E33C et IF1 L54C seront présentées ici. L'étude des mutants cités ci-dessus sera approfondie une fois que le marquage des peptides aura été mis au point.

I Mise au point du marquage

Les différentes étapes du marquage de spin ont déjà été décrites dans le Matériels et Méthodes, cependant il est nécessaire de mettre en évidence, dans cette partie Résultats, les difficultés qui ont pu être rencontrées au cours de ces derniers mois. La Figure 1.5 est un rappel de la Figure montrée dans le Matériels et Méthodes. Elle montre les différentes étapes du marquage qui représentent sans doute la partie la plus délicate dans cette étude d'oligomérisation de l'IF1. En effet lorsqu'on calcule le taux de marquage à la suite de l'analyse du spectre RPE et de la détection protéique à 280 nm, on obtient, le plus souvent, un taux de marquage de 20% pour les deux peptides mutés (E33C et L54C). Ce faible taux de marquage peut être dû à la réoxydation rapide des IF1 qui peut engendrer la formation de dimères ou de monomères contenant des fonctions SH réoxydées de type SO_3, SO_2H qui sont irréductibles. Plusieurs tentatives ont été effectuées dans le but d'améliorer le taux de marquage :

– En effectuant les étapes 1, 2, 3, 4 sous flux d'argon ou en boîte à gants pour éviter la réoxy-

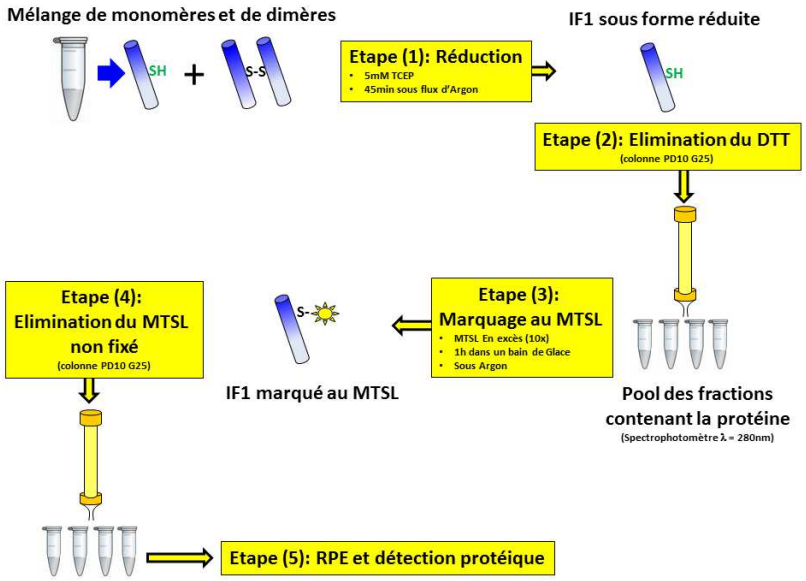


Figure 1.5: Protocole de marquage d'IF1 par le MTSL

dation instantanée des cystéines.

- En modifiant l'étape 3 par injections successives de MTSL en excès (10x).
- En diminuant la concentration d'IF1 de départ (précédant l'étape 1)

Malheureusement, aucune des trois premières tentatives n'a été fructueuse. Le taux de marquage reste constant à 20%. La plupart des résultats présentés ici sont issus de spectre d'IF1 marqués à 20 %. Cependant la diminution de concentration en IF1 de départ nous a permis d'avoir, dans un cas, un taux de marquage de 90 % pour l'IF1 E33C. Ce taux de marquage n'a jamais été reproduit. Les spectres présentés ici seront issus de peptides marqués à 20 % et de l'IF1 E33C marqué à 90 %.

II Contrôle de la structure des peptides par CD en UV lointain

Avant d'aborder l'étude par spectroscopie RPE, il est essentiel de vérifier la structure des peptides mutés produits. En effet, les mutations et/ou le marquage peuvent modifier la structure secondaire des protéines. Les mesures de CD UV-lointain permettent de visualiser la structure secondaire des protéines. Par cette technique les spectres CD obtenus pour les peptides mutés et marqués peuvent être comparés avec les spectres CD du peptide sauvage. Si les spectres CD diffèrent de la forme native alors la structure secondaire des peptides modifiés est altérée. Ici nous nous attendons à observer un spectre CD décrivant 2 pics négatifs à 210 nm et 225 nm caractéristique d'une hélice α. Les échantillons ont également été mis en présence de Trifluoroéthanol (TFE). Le TFE est souvent utilisé dans les études structurales de mesure de CD car il stabilise les structures secondaires. Ceci signifie que si une hélice α n'est pas tout à fait structurée, la présence de TFE permettra la restructuration correcte de l'hélice en hélice α. 20 à 40% de TFE sont habituellement ajoutés dans les échantillons.

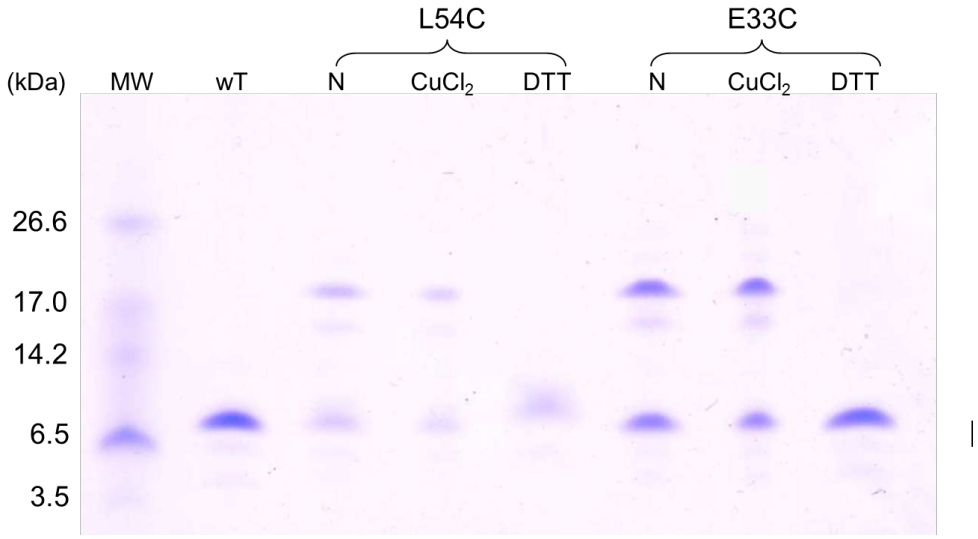
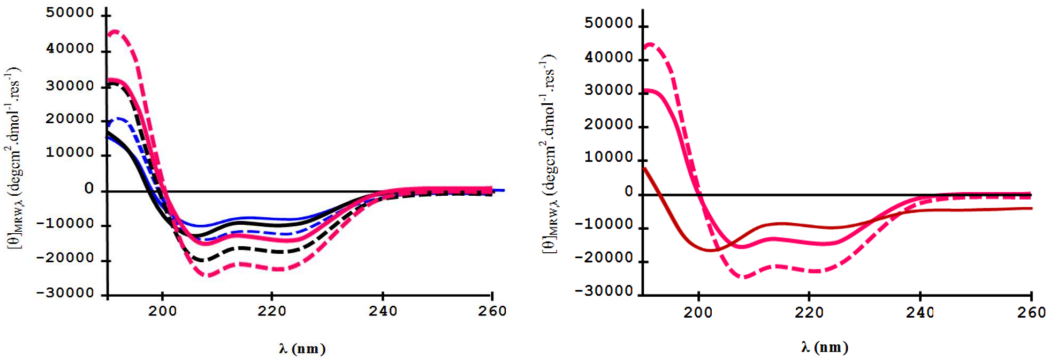


Figure 1.6: **Gel SDS-PAGE 12% montrant les IF1-E33C et IF1 L54C marqués au MTSL (20%) +/- traité avec 1 mM $CuCl_2$ ou 4mM DTT**. 1mg de protéine est chargé dans chaque puit. N : IF1 E33C ou IF1 L54C marqués au MTSL ; $CuCl_2$: IF1 E33C ou IF1 L54C marqué au MTSL incubés pendant 5 minutes en condition oxydante en présence de 1 mM $CuCl_2$; DTT : E33C ou IF1 L54C marqué au MTSL incubés pendant 5 minutes en présence de 4mM DTT. Les fractions marquées subissent un traitement oxydo-réducteur (1mM $CuCl_2$ ou 4mM DTT) pendant quelques minutes. Les puits dans lesquels l'IF1-E33C et l'IF1 L54C n'ont pas subi de traitement (N) montrent deux formes d'IF1. Une forme monomérique et une forme dimérique. Les fractions IF1 marquées traitées au $CuCl_2$ montrent également les deux formes monomère et dimère d'IF1, suggérant que la fraction monomérique de l'échantillon marqué n'est pas oxydable et que les cystéines ne sont donc pas sous forme SH. Ces fractions monomériques détectées dans les puits (N) et $CuCl_2$ contiennent bien les IF1 marqués au MTSL. En revanche toutes les fractions dimériques contenues dans le puits (N) peuvent être réduites par action du DTT.

Contrôle de la structure des IF1 cystéiques. La structure secondaire des IF1 cystéiques a été comparée avec la structure secondaire de l'IF1 wT en utilisant la technique de CD en UV lointain, en condition normale c'est-à-dire sans agent oxydo-réducteur. Les échantillons d'IF1 ont été préparé à une concentration de 0,1 $mg.mL^{-1}$ dans 10 mM de tampon phosphate de sodium ajusté à pH 7,0. La dilution du peptide s'est faite en présence ou en absence de TFE (20%). Les spectres obtenus pour les IF1 wT, L54C et E33C montrent que les peptides sont majoritairement structurés en hélice-α (Figure 1.7). Cependant l'ajout de 20% TFE semble induire un changement spectral relatif à une restructuration du peptide en hélice α pour tous les peptides présentés dans la Figure 1.7(a). Ceci amène à dire que le peptide IF1 n'est pas structuré en hélice sur toute sa longueur.

Contrôle de la structure des IF1 marqués au MTSL. Le marquage obtenu pour l'IF1 L54C n'étant que de 20%, seul le peptide IF1 E33C marqué à 90% par le MTSL a été soumis à des mesures de CD. En effet le spectre de l'IF1 L54C marqué représenterait majoritairement la forme IF1 L54C non marqué. La forme du spectre de l'IF1 E33C marqué au MTSL montre que la structure α-hélicale est conservée lors de l'ajout du marqueur de spin MTSL. Cependant la Figure 1.7(b) montre que l'intensité et la forme du spectre de l'IF1 E33C marqué au MTSL sont quelque peu différentes de



(a) Spectres CD des IF1 wT, E33C et L54C (b) Spectres CD de l'IF1 E33C +/- MTSL

Figure 1.7: **Contrôle de la structure α-hélicale des IF1 wT et cystéiques (E33C et L54C) par CD far-UV**. (a) En noir trait plein, l'IF1 wT en absence de TFE ; en bleu, l'IF1 L54C ; en rose, l'IF1 E33C. Toutes les courbes en pointillés représentent les spectres obtenus en présence de 20% de TFE. (b) En rose trait plein, IF1 E33C (-TFE) ; en rose trait en pointillés, IF1 E33C (+TFE) ; en rouge IF1 E33C marqué au MTSL (-TFE)

celles des 2 autres spectres de l'IF1 E33C + ou - TFE. La forme du spectre de l'IF1 E33C marqué au MTSL montre une perte de structure en hélice α par rapport au peptide IF1 E33C non marqué.

III Analyse des spectres RPE

Exemple de spectres, interprétations et définitions. Les composés nitroxide sont des centres paramagnétiques anisotropiques caractérisés par l'interaction entre le spin électronique spin $= \frac{1}{2}$ et le spin nucléaire $= 1$ qui provient du magnétisme de l'azote qui est à proximité d'électrons non appariés. L'anisotropie du tenseur g (Effet Zeemann) et du tenseur A (interaction hyperfine) sont les deux éléments permettant d'interpréter les spectres. Le spectre RPE associé au composé nitroxide est fortement dicté par la mobilité du composé dans son environnement. La Figure 1.8 montre les différents types de spectres obtenus pour différents cas de mobilité du composé nitroxide dans son environnement. La mobilité est ici exprimée en fonction des temps de corrélation observés. Cette Figure et l'explication qui s'ensuit nous seront très utiles pour interpréter les spectres des 2 mutants marqués.

- (A) En solution, à température ambiante, les radicaux se meuvent rapidement et de manière isotrope. Les interactions magnétiques (tenseurs A et tenseur g) sont alors moyennées et le spectre du radical nitroxide est composé de troies raies fines et équidistantes. Le composé nitroxide n'a donc pas de contrainte environnementale autour de lui. Le temps de corrélation qui lui est associé est donc très court ($<10^{-9}$s).
- (B) Lorsque le nitroxide est greffé à une protéine, sa mobilité est réduite et contrainte par l'environnement protéique. L'anisotropie des interactions magnétiques n'est plus totalement moyennée et il en résulte un élargissement des raies. Le temps de corrélation devient plus long (10^{-9}s) et le spectre montre des raies qui s'élargissent. La mobilité du marqueur dépend de son environnement (τ_{loc}) et du mouvement aléatoire de la protéine elle-même (τ_{prot}). $\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_{prot}} + \frac{1}{\tau_{loc}}$

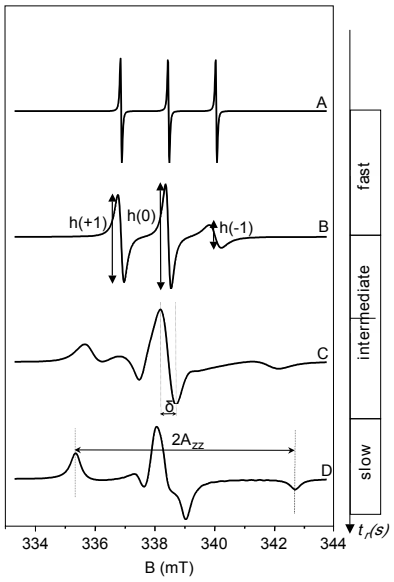


Figure 1.8: Illustration du changement de forme spectrale d'un radical nitroxide selon son régime de mobilité.

- (C) Lorsque la restriction de mobilité de la sonde devient plus importante, l'effet de moyenne des interactions magnétiques devient de moins en moins efficace conduisant à un élargissement important du spectre. C'est ce qu'on observe lorsque la mobilité des marqueurs est contraint par l'approche d'une autre protéine ou d'un autre marqueur.
- (D) Enfin, en solution gelée, le marqueur devient immobile et le temps de corrélation devient alors supérieur à 10^{-6} s. L'effet de l'anisotropie des tenseurs g et hyperfin est pleinement observé et conduit à un spectre large. Dans ce cas, il est possible d'observer exclusivement l'interaction entre deux marqueurs.

Spectre à bande X de l'IF1 E33C et l'IF1 L54C à 298K (température ambiante) et à 100K (basse température)

Les analyses à température ambiante (298K) et à basse température (100K) donnent accès à des informations différentes. Les expériences à température ambiante sont difficiles à interpréter car elles rendent compte de différents paramètres qui sont :

- la vitesse de rotation du marqueur
- l'environnement protéique dans lequel le marqueur se trouve
- le mouvement aléatoire de la protéine
- L'interaction entre deux marqueurs

Les expériences à basse température sont indispensables dans notre cas, car elles suppriment les paramètres de mobilité du marqueur ou de la protéine. Elles permettent ainsi d'observer s'il existe une interaction entre deux marqueurs. Marlène Martinho a ainsi mesuré des spectres à température ambiante et à basse température sur l'IF1 wT, les mutants IF1 E33c et IF1 L54C.

Spectres du MTSL libre, de l'IF1 E33C et l'IF1 L54C obtenus à 298K. La Figure 1.9 montre les spectres du MTSL libre, de l'IF1 E33C et de l'IF1 L54C tous deux marqués à 20%. Ces

spectres ont été mesurés à température ambiante (298K). Le spectre de la sonde libre est nécessaire car il permet de voir d'une part si le marqueur a bien été fixé sur les protéines et d'autre part de pouvoir comparer la mobilité de la sonde sur les IF1 marqués à celle de la sonde libre. Contrairement au spectre du MTSL libre, ceux de l'IF1 L54C et de l'IF1 E33C présente trois raies plus larges qui caractérisent le marquage des IF1 mutés par le MTSL. Pour un même taux de marquage (20 %), les spectres de ces deux mutants présentent des différences. Le spectre de l'IF1 E33C est plus large que celui de l'IF1 L54C. Dans le cas de l'IF1 E33C, l'élargissement des raies signifierait que le marqueur est moins mobile pour des raisons liées à l'environnement structural du marqueur ou qu'il existe une interaction entre deux marqueurs. Pour vérifier l'une ou l'autre des deux hypothèses, il est nécessaire d'effectuer des expériences à basse température de manière à supprimer le paramètre de mobilité du marqueur.

Spectres obtenus à 100K. Comme il l'a été expliqué dans la section III, la basse température modifie les propriétés magnétiques du système et le temps de corrélation est très long. Les spectres observés ne rendent plus compte de la mobilité du marqueur mais bien de la communication entre deux marqueurs. Pour un même taux de marquage, l'aire sous la courbe est identique pour les deux mutants mais les raies du spectre de l'IF1 E33C sont plus larges que celles de l'IF1 L54C. Ce résultat suggère fortement que les marqueurs de deux monomères d'IF1 interagissent ensemble, ce qui favoriserait l'hypothèse de formation du dimère d'IF1 par la région médiane, soit l'interface T.

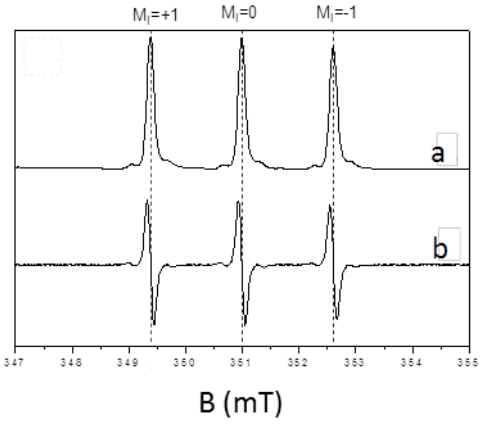
Comment favoriser la formation de dimères d'IF1 marqués ?

Les résultats obtenus à 298K nous ont montré que seul l'IF1 E33C présentait une largeur de raie évoquant un changement structural au niveau de l'hélice et/ou la proximité de deux marqueurs. Mais les données à basse température sont plus encourageantes encore car la différence de spectre entre l'IF1 L54C et l'IF1 E3CC nous a révélé l'interaction entre les marqueurs de deux IF1 E33C. Ces résultats ne sont hélas pas suffisants pour confirmer l'interface de dimérisation du peptide. Dans l'idéal, il serait bienvenu de pouvoir déplacer l'équilibre monomère/dimère vers la forme monomérique ou vers la forme dimérique de façon à pouvoir observer une variation spectrale significative. Nous avons donc choisi d'approfondir l'étude de l'oligomérisation d'IF1 en essayant de :

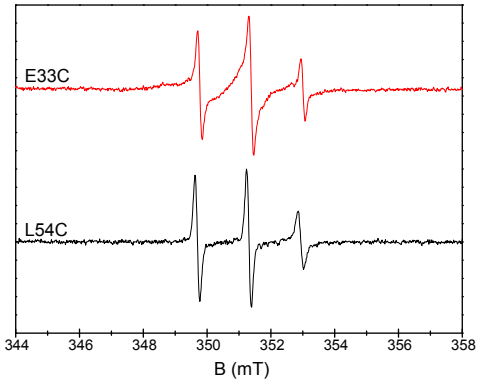
1. modifier la concentration en IF1 E33C marqués. L'augmentation de la concentration en IF1 marqués permettrait de favoriser la formation d'"homodimères doublement marqués". Comme le pourcentage de peptides marqués est faible (20 %), la modification de la concentration en IF1 E33C marqués modifierait aussi les proportions en "hétérodimères monomarqués" (IF1 E33C marqués-IF1 E33C).
2. rajouter un excès d'IF1 wT. L'ajout d'IF1 wT en excès permettrait de déplacer l'équilibre de la forme "homodimères doublement marqués" vers la forme "hétérodimères simplement marqués".

Bien sûr ces résultats seuls sont incomplets car pour être validés, ce même protocole doit être appliqué rigoureusement sur l'IF1 L54C.

Variation de la concentration en IF1 E33C marqué Pour pouvoir augmenter la concentration en IF1 E33C marqué, différents échantillons d'IF1 E33C marqués ont été réunis, puis concentrés sous flux d'argon toute la nuit. la concentration maximale obtenue est de 132 μM. Cette solution



(a) Spectre du MTSL libre



(b) Spectre de l'IF1 E33C et de l'IF1 L54C

Figure 1.9: **Spectres RPE du MTSL libre, de l'IF1 E33C et de l'IF1 L54C à 298K**. (a) Signal du spectre RPE du marqueur libre et son signal dérivé. Le spectre dérivé du marqueur libre est caractérisé par trois raies de même amplitude et est caractéristique d'une sonde monde mobile (τ_c <10^{-9}s) non contrainte par son environnement. Les spectres qui seront montrés sous forme de dérivée première des spectres. (b) En rouge, spectre obtenu pour l'IF1 E33C et en noir, les spectre obtenu pour l'IF1 L54C.

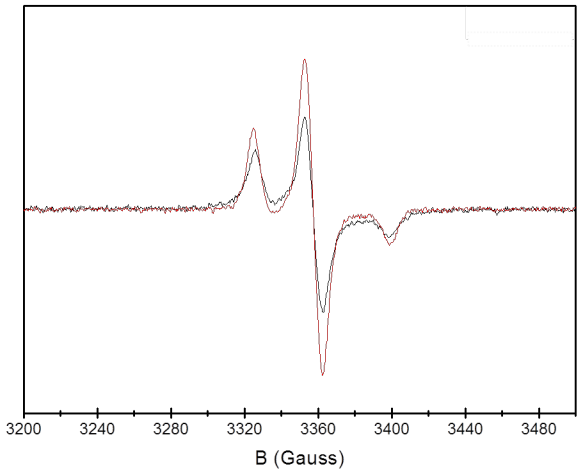
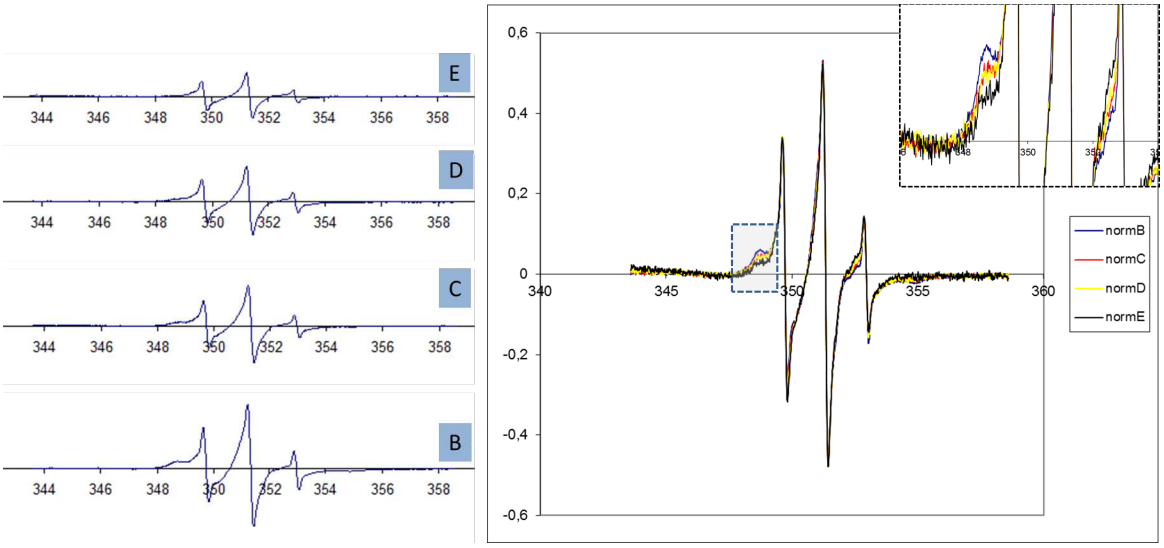


Figure 1.10: **Spectres RPE obtenus pour l'IF1 E33C et l'IF1 L54C à 100K**. En noir, le spectre de l'IF1 E33C. En rouge, le spectre de l'IF1 L54C.

a ensuite été diluée 1,3, 1,8 puis 2,6 fois dans du tampon Mes 10 mM, pH 6,5 pour obtenir quatre solutions d'IF1 E3CC marqués. Chacune des solutions a été soumise à une analyse par spectroscopie RPE à température ambiante. La Figure 1.11 donne les spectres en fonction des différentes concentrations d'IF1. Après normalisation des spectres, on peut voir l'apparition d'un léger épaulement à 348,7 mT dès 50 μM. Cette modification spectrale s'intensifie avec la concentration en IF1 marqués. Ceci montre que quelque chose se produit dans l'environnement de la sonde. Le faible taux de marquage et la température ambiante ne nous permettent pas d'aborder ce résultat de façon univoque. Il peut être dû à l'interaction entre deux marqueurs dans un homodimère doublement marqué. Mais il peut aussi être dû à un changement d'environnement de la sonde induit par l'interaction d'une autre molécule d'IF1 marqués ou non. Dans tous les cas cela suggère que le marqueur est situé dans l'interface de dimérisation.

Ajout d'IF1 wT en excès sur l'échantillon d'IF1 E33C marqué. Pour compléter les expériences de variations de concentrations en IF1 marqué, une deuxième expérience a été mise en place. Dans cette expérience, 5 EQ d'IF1 wT ont été ajoutés dans la solution d'IF1 E33C (40 μM) marqué à 20 %, puis un spectre a été réalisé. 1 EQ (équivalent) correspond à une concentration de 40 μM. La Figure 1.12 montre un changement de la forme spectrale qui se traduit par un élargissement de raie lorsque 5 EQ d'IF1 wT sont ajoutés dans la solution d'IF1 E33C marqués (spectre rouge). Il apparait aussi un petit épaulement vers 348 mT sur le spectre de l'IF1 E33C marqué qui semble s'amplifier lorsque 5 EQ d'IF1 wT sont ajoutés dans l'échantillon d'IF1 E33C marqués. Ce petit épaulement est identique à celui qui a été observé dans les expériences de variation de concentration en IF1 E33C marqués. Son intensité est amplifiée lorsqu'on ajoute de l'IF1 en excès.

Dans les deux expériences ci-dessus, un changement spectral apparaît sous forme de l'apparition d'un épaulement vers 348 mT. Étant donné que la concentration en IF1 est au moins dix fois supérieure au K_i, on peut considérer que nous n'avons que des dimères d'IF1 en solution. Les dimères



(a) (b)

Figure 1.11: **Effet de l'augmentation de la concentration en IF1 marqué sur la forme des spectres à 298K.**(a) Spectres RPE en fonction de la concentration en IF1 marqués (20%). De haut en bas,(E) 50 μM, (D) 75 μM, (C) 100 μM et (B) 132 μM. (b) montre les spectres E, D, C, B de la Figure 1.11 (a) qui ont été normalisés à la somme des valeurs algébriques des pics négatifs et positifs de la deuxième raie. L'encadré en haut à droite est un zoom de la partie du spectre comprise entre 347 mT et 350 mT qui montre l'épaulement à 348,5 mT.

d'IF1 peuvent être de différentes natures. On peut avoir des homodimères doublement marqués, des hétérodimères simplement marqués et des dimères non marqués. Dans le premier cas, il apparaît lorsque la concentration en IF1 E33C partiellement marqué augmente. Dans la deuxième expérience il apparaît lorsqu'on ajoute de l'IF1 wT en excès dans une solution. Quoi qu'il en soit, l'apparition de cet épaulement suggère que la forme du spectre dépendrait de la quantité de dimères marqués en solution, qu'ils soient homodimères doublement marqués ou hétérodimères monomarqués. Ce changement spectral pourrait alors se traduire par une modification dans l'environnement de la sonde nitroxide par contact avec une autre sonde ou par l'approche d'une autre molécule d'IF1 marqué ou non. Ces deux résultats complémentaires semblent encourageants car il semblerait que l'environnement du résidu E33C soit modifié, auquel cas, nous pouvons espérer que la dimérisation du peptide se fasse par la région médiane, soit par l'interface T.

G Discussion, mises au point et perspectives

I Les résultats préliminaires tendent-ils à favoriser la formation du dimère par l'interface T ?

Les expériences à 298K et à 100K Pour un même taux de marquage (20 %), le spectre de l'IF1 E33C à température ambiante montre des raies plus larges que le spectre de l'IF1 L54C. A température ambiante, comme il l'a été expliqué dans la section 1.8, on peut déduire deux informations :

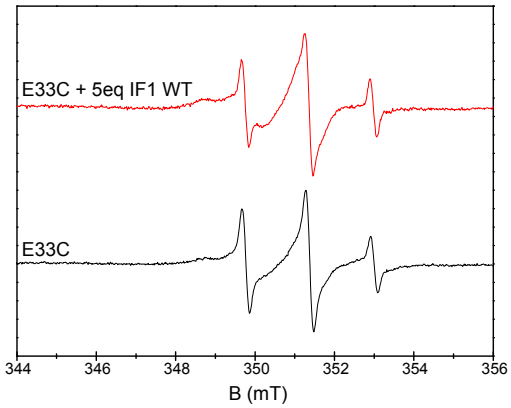


Figure 1.12: **Expérience de compétition entre l'IF1 wT et l'IF1 E33C.** La concentration initiale en IF1 E33C (spectre noir) est de 40 μM. 1 EQ correspond à la concentration initiale en IF1 E33C marqué, soit 40 μM. Pour le spectre rouge, la concentration ajoutée en IF1 wT de 5 EQ correspond donc à 200 μM. La concentration finale en IF1 total dans le tube RPE est donc de 240 μM

- la mobilité de la sonde
- l'environnement dans lequel la sonde se trouve

Dans le cas du L54C, les raies du spectre sont très étroites, ce qui suggère que la sonde pourrait être dans un environnement en hélice moins structurée mais aussi que la sonde ne communique pas avec une autre sonde. Dans le cas de l'IF1 E33C, l'élargissement de raie indique que la sonde semble moins mobile du fait qu'elle se retrouve dans une région fortement structurée en hélice α. Cette différence de spectre pourrait aussi se traduire par le fait que la sonde soit en contact avec une autre sonde, ce qui suggérerait que l'IF1 E33C formerait des dimères. Les expériences à basse température viennent compléter les expériences effectuées à température ambiante car elles permettent de supprimer le paramètre de mobilité de la sonde ou de la protéine elle-même. Lorsque les spectres à 100K des deux mutants marqués sont superposés, on peut voir un élargissement de raie pour l'IF1 E33C marqué. Ce résultat est très important car il montre assez clairement qu'il pourrait se former des dimères d'IF1 par l'interface T.

Le problème des dimères monomarqués Les résultats obtenus sur l'IF1 E33C étant prometteur, l'étude de l'oligomérisation du peptide n'a été poursuivi que sur le peptide IF1 E33C. Bien sûr, pour être rigoureux, une étude similaire devra être faite sur l'IF1 L54C. Deux études ont été faites pour essayer de moduler la concentration de dimères marqués. Tout d'abord la concentration en IF1 marqués a été augmentée ce qui a permis de former des homodimères doublement marqués et des hétérodimères monomarqués. Dans une deuxième expérience, une concentration d'IF1 wT 5 fois plus élevée par rapport à l'échantillon d'IF1 E33C marqué a été utilisé et a permis de favoriser la formation d'hétérodimères monomarqués au détriment d'homodimères doublement marqués. Qu'on augmente la concentration en IF1 marqué ou qu'on ajoute un excès d'IF1 wT, on remarque un changement spectral. Dans les deux cas, l'environnement de la sonde semble être modifié. Il peut être modifié par l'interaction avec une autre sonde porté par un monomère d'IF1 (homodimères doublement marqués) ou par l'approche d'un monomère d'IF1 non marqué qui viendrait s'associer avec un IF1 marqué malgré la présence de la sonde. Bien sûr ces résultats néanmoins intéressants

exigent d'être enrichis. Pour pouvoir interpréter ces résultats correctement, le taux de marquage doit être amélioré de façon à avoir des spectres plus fins et plus aisés à analysés, des expériences à basse température en ajoutant de l'IF1 wT dans l'échantillon seraient également les bienvenues.

II Les points à améliorer

Comme il l'a été dit dans la section précédente, le taux de marquage est faible $\sim 20\%$. Différents essais ont été menés pour améliorer le taux de marquage :

1. la boîte à gants pour éviter la réoxydation instantanée des peptides cystéiques à l'air libre. En effet, il semblerait que la réoxydation des cystéines conduisent à des formes sulfiniques qui ne sont absolement plus réductibles.
2. la modification de pH lors de la réduction des cystéines et lors du marquage. Dans notre cas, le K_d de dissociation de l'IF1 wT de levure est de 6 μM à pH 6,0. Ceci signifie que lorsque les concentrations sont supérieurs à 6 μM, la forme dimérique est favorisée. Or jusqu'à présent, la plupart des tentatives de marquage a été fait en utilisant de fortes concentrations en IF1 (100 μM) à pH 6,5. Ceci pourrait expliquer le faible taux de marquage obtenu (20 %). Pour favoriser le marquage, il serait sans doute judicieux d'augmenter le pH pour augmenter le K_d et pour favoriser la formation de monomères d'IF1 mutés et ainsi espérer un meilleur taux de marquage.

III Les perspectives avec les mutants prévus

Une fois que la technique de marquage sera bien maîtrisée, il sera intéressant de voir si le résidu E21 joue un rôle dans la sensibilité d'IF1 au pH [96]. Si l'IF1 de levure est aussi sensible au changement de pH que ne l'est le peptide bovin, on peut s'attendre à ce que le résidu E21 joue le même rôle que le résidu H49 (*B.taurus*). La protonation du glutamate induirait un changement de conformation de l'hélice qui favoriserait la formation du dimère d'IF1. La mutation de ce résidu en alanine serait très utile à cette étude car elle pourrait rendre IF1 insensible au pH et empêcher la formation de dimère. Dans ce cas, nous verrions un changement de forme de spectre pour l'IF1 E33C E21A qui irait dans le sens d'un rétrécissement de la largeur des raies aussi bien à température ambiante (298K) qu'à basse température (100K). Ceci signifierait que la dimérisation de l'IF1 se ferait bien par l'interface T.

Pour compléter l'étude de la dimérisation d'IF1 de levure, le mutant H39C a également été produit. Par l'approche de RPE pulsée nommée DEER, il est possible de mesurer des distances entre deux marqueurs et ainsi favoriser l'une ou l'autre des deux interfaces. La technique de DEER permet de mesurer des distances comprises entre 20 et 60 Å. Les distances mesurées sur le tétramère bovin, Figure 1.4 sont 23 Å pour l'interface T et 63 Å pour l'interface D. Si par DEER on arrive à déduire des spectres une distance proche de l'une ou l'autre de ces distances, on pourra confirmer que le dimère se fait par une interface plutôt que l'autre.

Chapitre 2

Pourquoi IF1 est-il reconnu spécifiquement par les ATP synthases mitochondriales ?

A Introduction

Comme il a été énoncé dans l'introduction, IF1 est le régulateur spécifique des ATP synthases mitochondriales. C'est un peptide à action unidirectionnelle qui inhibe uniquement l'hydrolyse d'ATP. Les IF1 de différentes espèces peuvent inhiber *in vitro* n'importe quelles ATPases mitochondriales [26] mais n'ont aucune action sur les ATP synthases bactériennes ou chloroplastiques qui possèdent leur propre système de régulation[79][97]. En effet, des expériences cinétiques d'inhibition faites au laboratoire ont montré que l'activité hydrolytique des ATP synthases bactériennes ou chloroplastiques n'étaient pas inhibées après ajout d'une concentration saturante de 5 μM d'IF1 (résultats non publiés). Une des questions qui se pose alors est l'origine moléculaire de cette exclusivité d'action d'IF1 pour les ATP synthases mitochondriales. La comparaison des séquences des sous-unités α et β de la partie F_1 d'ATP synthases mitochondriales avec la partie F_1 d'ATP synthases bactériennes et chloroplastiques a permis d'identifier les résidus plus ou moins spécifiques du monde mitochondrial. Mais l'alignement de séquences n'est pas parfait et ne suffit pas à déterminer les résidus qui pourraient être responsables de la spécificité d'IF1 pour les ATP synthases mitochondriales. L'observation du complexe inhibé bovin [98](pdb :2v7q) est un outil précieux car associé aux données de l'alignement de séquences, il nous a permis de choisir des résidus proches du peptide IF1. Bien sûr le modèle structural de référence est celle de *B.taurus*, mais la forte homologie de séquences entre l'ATP synthase de *B.taurus* et celle de *S.cerevisiae* nous permet de transposer le choix des résidus sur le modèle levure. Les résidus sélectionnés chez la levure sont alors mutés en leurs homologues non mitochondriaux.

Vincent Corvest et Yuan Luo avaient initié cette étude en sélectionnant quatre résidus sur la sous-unité β. Les alignements de séquence sont présentés dans le "Matériels et Méthodes". Notons qu'aucun résidu proche d'IF1 n'a été trouvé comme totalement spécifique. La Figure 2.1 montrent les résidus homologues à ceux qui ont été mutés sur la sous-unité β et le Tableau 2.1 présentent les résidus sélectionnés de la sous-unité β et leurs proches voisins sur IF1. Les résultats obtenus sur ces mutants de β seront montrés dans la partie II. Quatre mutants ont été choisis et produits dans *S.cerevisiae* :

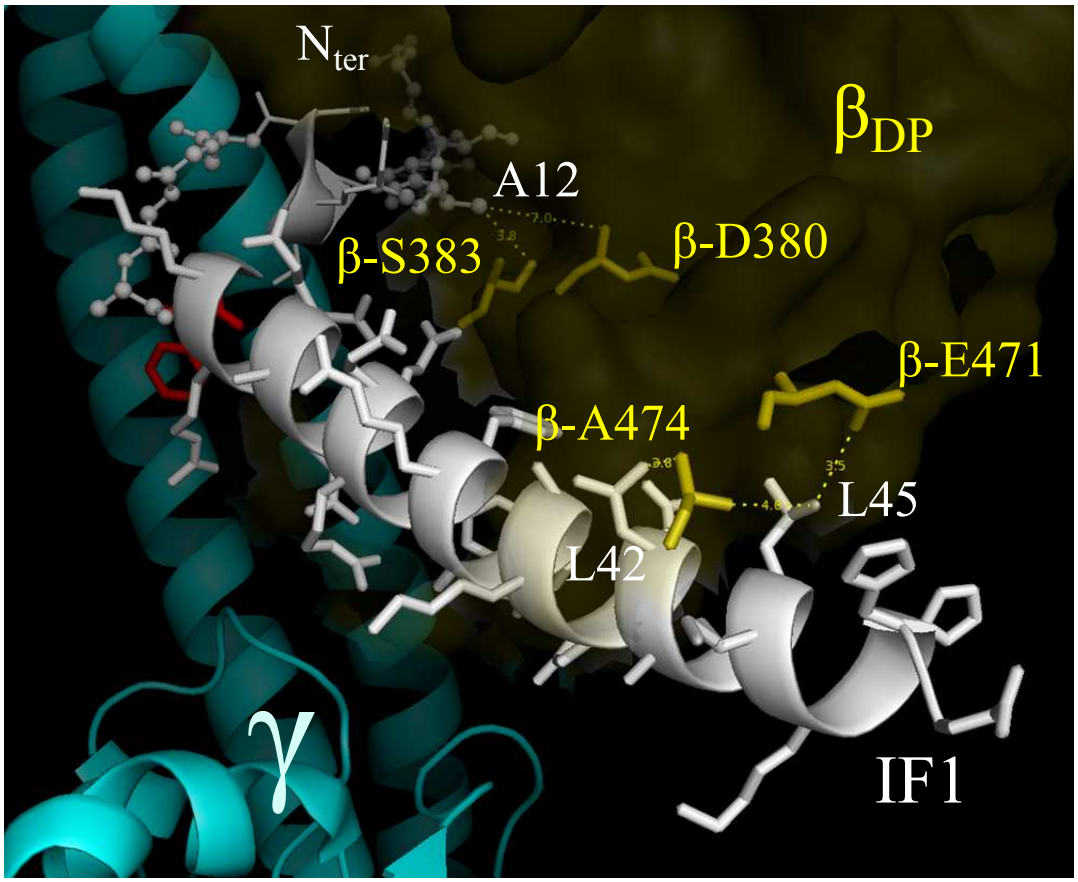


Figure 2.1: **Résidus de la sous-unité β spécifiques des ATP synthases mitochondriales à proximité d'IF1**. IF1 est blanc, représenté en mode cartoon. Les résidus de la sous-unité β_{DP} situés à proximité d'IF1 sont représentés en jaune, en mode bâton. Les résidus d'IF1 avec lesquels ils interagissent sont notés en blanc et les distances entre les résidus de la sous-unité β et les résidus d'IF1 sont également notés.

- β-T380R-S383E
- β-E471K-A474E
- β-T380R-S383E-E471K-A474E

B Travail de thèse

Dans cette thèse, nous avons poursuivi ce travail de recherche de la spécificité d'IF1 pour les ATP synthases mitochondriales sur la base de résidus spécifiques au monde mitochondrial et celle de la proximité de ces résidus par rapport à IF1. De la même manière que pour la sous-unité β, nous avons choisi cinq résidus sur la sous-unité α situés proches d'IF1 qui semblent être spécifiques au monde mitochondrial (Figure 2.2). Les alignements de séquences sont montrés dans le "Matériels et Méthodes".

F_1-β *B.taurus*	F_1-β *S.cerevisiae*	Mutation	Distances	IF1 *B.taurus*	IF1 *S.cerevisiae*
D380	T380	R	7 Å	E30	E25
S383	S383	E	3,1 - 3,5 Å	A12	?
D471	E471	K	3,5 Å	L45	L40
A474	A474	E		L42	L37
				L45	L40

Tableau 2.1: **Mutations sur** β. La structure du complexe inhibé bovin (**pdb** :2v7q) a permis de répertorier les résidus situés sur la sous-unité β à proximité du peptide bIF1 et relativement spécifiques des ATP synthases mitochondriales. Les homologues de ces résidus chez la levure sont indiqués et ils ont été mutés en leurs homologues non mitochondriaux. Les distances notées dans ce tableau correspondent aux distances entre chaque résidu sélectionné de la sous-unité β et le résidu le plus proche d'IF1. Les résidus de bIF1 interagissant avec les résidus de la sous-unité β sont également listés avec leurs correspondants levure.

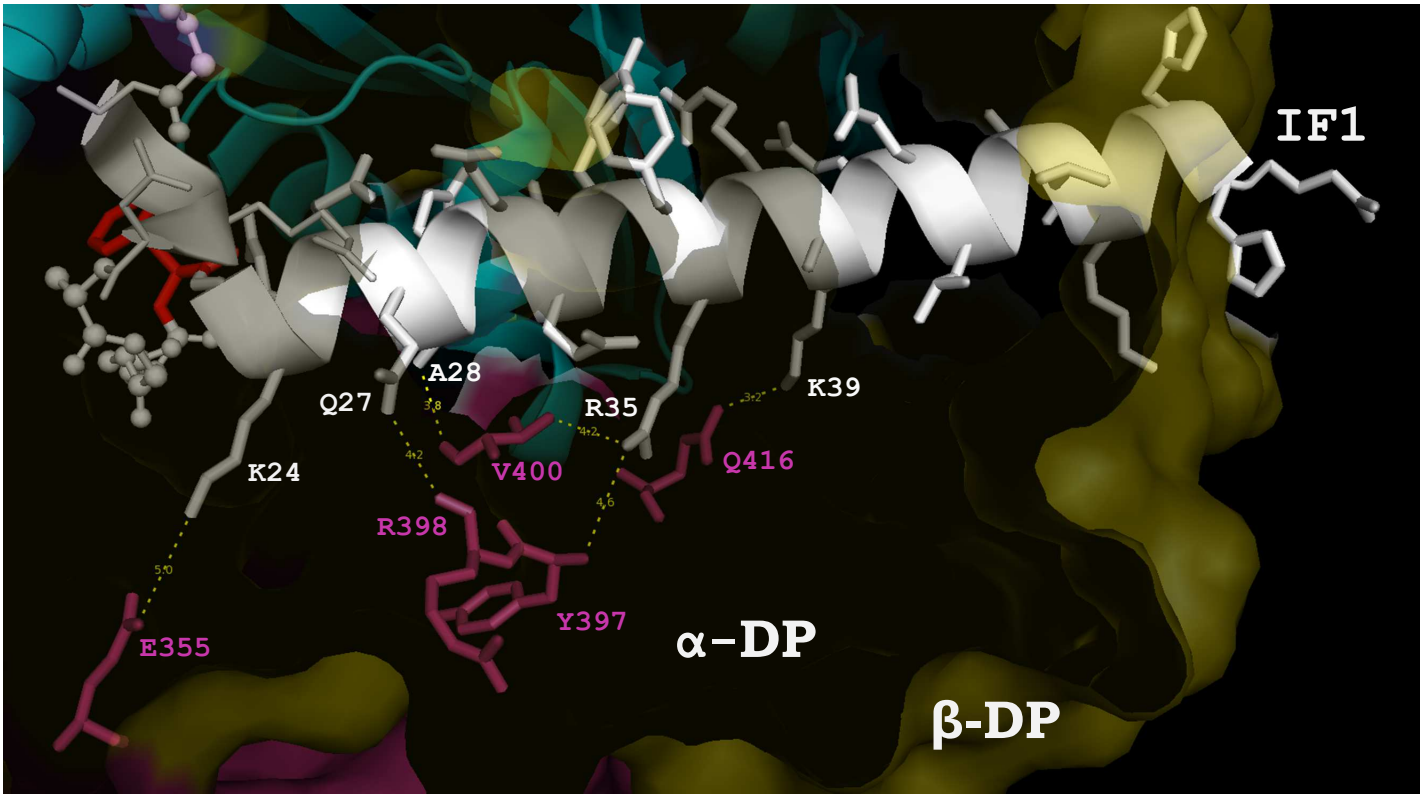


Figure 2.2: **Résidus de la sous-unité** α **spécifiques des ATP synthases mitochondriales et situés à moins de 6 Å d'IF1**. IF1 est blanc, représenté en mode cartoon. Les résidus de la sous-unité α_{DP} situés à moins de 6 Å d'IF1 sont représentés en rose, en mode bâton. Les résidus d'IF1 avec lesquels ils interagissent sont notés en blanc et les distances entre les résidus de la sous-unité β et les résidus d'IF1 sont également notés.

F_1-α *B.taurus*	F_1-α *S.cerevisiae*	Mutation	Distances	IF1 *B.taurus*	IF1 *S.cerevisiae*
E355	E357	D	5 Å	K24	K19
Y397	Y399	F	4,6 Å	R35	R30
R398	R400	A	4,2 Å	Q27	R22
V400	V402	L	4,2 Å	R35	R30
			3,8 Å	A28	A23
Q416	Q418	N	3,2 Å	K39	K34

Tableau 2.2: **Mutations sur** α. La structure du complexe inhibé bovin (**pdb** :2v7q) a permis de répertorier les résidus situés sur la sous-unité α à proximité du peptide bIF1 et relativement spécifiques des ATP synthases mitochondriales. Les homologues de ces résidus chez la levure sont indiqués et ils ont été mutés en leurs homologues non mitochondriaux. Les distances notées dans ce tableau correspondent aux distances entre chaque résidu sélectionné de la sous-unité α et le résidu le plus proche d'IF1. Les résidus de bIF1 interagissant avec les résidus de la sous-unité α sont également listés avec leurs correspondants levure.

C Résultats

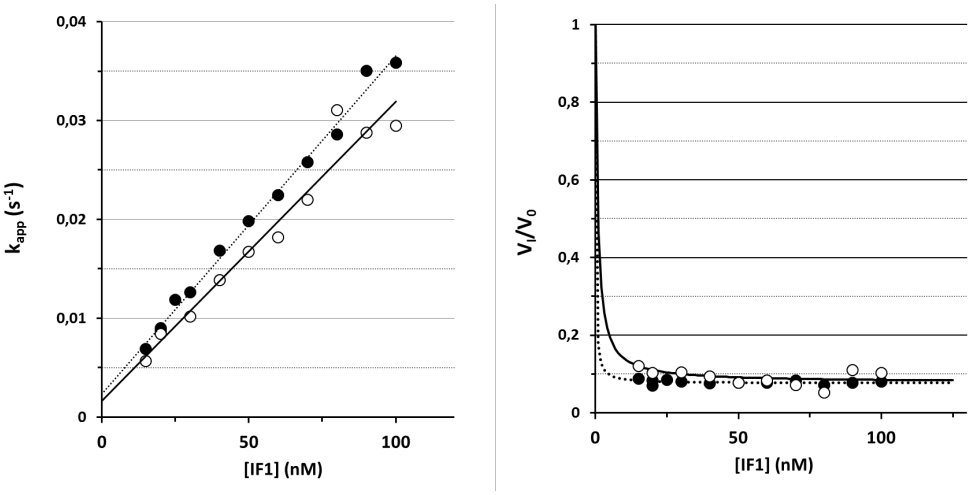
Les mutations qui ont été sélectionnées sont assez nombreuses. En effet, il existe 4 mutations ponctuelles sur la sous-unité β et cinq sur la sous-unité α et le nombre de combinaisons possible pour former des mutants est très nombreux. Il aurait été possible d'étudier chaque mutation individuellement, cependant nous avons essayé de regrouper les mutations sur chacune des sous-unité en choisissant les résidus les plus proches des uns des autres dans la séquence primaire et dans la structure du complexe inhibé. De cette façon, nous espérons aussi avoir un effet maximum sur la reconnaissance du peptide par l'ATP synthase de levure. 3 mutants de la sous-unité β et 4 mutants de la sous-unité α ont donc étés choisis et produits dans *S.cerevisiae* et soumis à analyse fonctionnelle. Dans le cas des mutants sur la sous-unité β, les 4 mutations ont été regroupées deux par deux, puis ont été cumulées pour faire un quadruple mutant. Les cinétiques ont été traitées pour chacun des trois mutants produits. Dans le cas des mutants de la sous-unité α, deux mutants ponctuels, un triple mutant et un quintuple ont été produits et seul le quintuple mutant a été étudié fonctionnellement.

I Effet des mutations de la sous-unité α sur l'inhibition de l'ATPase par IF1

La Figure 2.2 montre les résidus qui ont été mutés sur la sous-unité α. Parmi ces résidus mutés différentes combinaisons sont possibles pour former des mutants. Nous avons choisi de faire 4 mutants :

- deux mutants ponctuels : E357D et Q418N
- un triple mutant : Y399F, R400A et V402L qu'on appellera "**FAL**"
- un quintuple mutant : E357D, Y399F, R400A, V402L, Q418N qu'on appellera **D-FAL-N**

Ces quatre mutants ont été produits dans *S.cerevisiae* mais nous n'avons pas étudier l'ensemble des mutants. Pour répondre à la question de la spécificité d'interaction entre IF1 et la partie F_1 de l'ATP synthase, il nous a semblé judicieux d'étudier en priorité le quintuple mutant **D-FAL-N**. Après avoir préparé des mitochondries pour chaque mutant, les mitochondries sont diluées 10 à 15 fois dans un tampon Tris(SO_4), EDTA 100μM pH 8 puis soniquées pour former des particules submitochondriales (SMP). La Figure 2.3 montre le résultat des études cinétiques d'inhibition faites



(a) (b)

Figure 2.3: **Résultats cinétiques obtenus sur le mutant α-D-FAL-N à pH 6,5**. (a) Constante cinétique d'inhibition (k_{app}) en fonction de la concentration en IF1. (⋯●⋯) : SMP wT ; (–○–) : SMP α-D-FAL-N. Les conditions de mesure et les analyses cinétiques sont décrites dans le "Matériels et Méthodes". (b) Rapport entre la vitesse finale d'hydrolyse (V_I) et la vitesse initiale d'hydrolyse (V_0) en fonction de la concentration en IF1. (⋯●⋯) : SMP wT ; (–○–) : SMP α-D-FAL-N. Les conditions de mesure et les analyses cinétiques sont décrites dans le "Matériels et Méthodes".

sur SMP à pH 6,5. La Figure 2.3(a) montre la constante de vitesse apparente (k_{app}) en fonction de la concentration en IF1. La constante de vitesse de formation du complexe IF1-F_1, k_{on}, est la pente de la droite. Son expression est développée dans le Matériels et Méthodes. Elle donne une information sur une des premières étapes de l'inhibition de l'ATPase : la reconnaissance du peptide par l'enzyme. Dans la Figure 2.3(b) est représentée l'activité résiduelle après inhibition en fonction de la concentration en IF1. A demi-inhibition on obtient la constante de dissociation à l'équilibre thermodynamique K_i qui reflète la stabilité du complexe IF1-F_1. Le paramètre cinétique k_{on} est ici déterminant pour affirmer qu'un résidu ou qu'un groupe de résidus est responsable de la spécificité d'action du peptide sur les ATP synthases mitochondriales. Dans la Figure 2.3, on peut voir que ni le k_{on}, ni le K_i ne semblent être affectés. En effet, d'après les analyses cinétiques le k_{on} du wT (3,0 x $10^5 M^{-1}.s^{-1}$) est presque identique à celui du mutant D-FAL-N (3,0 x $10^5 M^{-1}.s^{-1}$). Au vu de ces résultats, il est peu probable que les cinq résidus jouent un rôle dans la reconnaissance du peptide par l'enzyme sauf si certaines mutations viennent à se compenser par un hasard malencontreux.

Il est sans doute inutile pour l'instant de penser à faire l'étude cinétique des autres mutants proposés en introduction de ce Chapitre.

II Effet des mutations de la sous-unité β sur l'inhibition de l'ATPase par IF1

Une étude plus complète de relargage et de fixation du peptide avait été réalisée à différents pH sur les mutants de β par Vincent Corvest et Yuan Luo. Nous ne décrirons pas ici l'ensemble de ces résultats mais nous nous attarderons sur les résultats qui ont été obtenus à pH 6,5 pour pouvoir les comparer avec ceux qui ont été obtenus sur les mutants de la sous-unité α. Les paramètres cinétiques

	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	K_i (nM)
wT	3,7 x 10^5	<1
T380R-S383E	2,4 x 10^5	2
E471K-A474E	3 x 10^4	<1
T380R-S383E-E471K-A474E	2,5 x 10^4	37

Tableau 2.3: **Paramètre cinétique de fixation d'IF1 sur l'ATPase modifiée et constante thermodynamique de dissociation otenues sur SMP à pH 6,5**

de fixation (k_{on}, K_i) ont été rassemblés dans le Tableau 2.3. La valeur du k_{on} du double mutant β-T380-S383E (2,4 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$) n'est pas très différente de celle du wT (3,7 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$) soit 1,5 fois inférieure. En revanche les valeurs de k_{on} du double mutant β-E471K-A474E et du quadruple mutant β-T380R-S383E-E471K-A474E (3 x 10^4 et 2,5 x 10^4 $M^{-1}.s^{-1}$) sont 12 à 15 fois inférieures à celles du wT. Ces résultats suggèrent que les résidus E471 et A474 seraient responsables de la diminution du k_{on}. Les double mutants β-T380R-S383E et β-E471K-A474E ont un K_i de 2 nM et inférieur au nM. Seul le K_i du quadruple mutant semble être sensiblement augmenté, soit au moins 37 fois plus élevé que celui du wT.

D Discussion et Perspectives

Dans ce Chapitre nous avons vu qu'IF1 inhibait toujours l'activité ATPasique malgré les mutations qui ont été faites sur les sous-unités α et β. L'étude cinétique effectuée sur SMP mutées nous a permis de déduire le paramètre cinétique k_{on} et la constante thermodynamique de dissociation K_i. Les valeurs de k_{on} sur SMP mutées comparées à celle sur SMP wT nous a permis d'apprécier la phase de reconnaissance du peptide par l'enzyme. La comparaison des valeurs de K_i nous a renseigné sur la stabilité du complexe inhibé IF1-F_1-ATPase mutées. Ainsi d'après ces deux données, on peut dire que les cinq mutations cumulées sur la sous-unité α ne modifient absolument pas le pouvoir inhibiteur du peptide. En revanche, les quatre mutations cumulées sur la sous-unité β affectent sensiblement plus le pouvoir inhibiteur d'IF1. Celui-ci n'est cependant pas annihilé et par conséquent l'ensemble des résidus mutés ici ne sont pas impliqués. Ce que nous pouvons dire en conclusion de ce Chapitre est que s'il existe une spécificité d'interaction entre l'ATP synthase mitochondriale et IF1, les résidus que nous avons mutés jusqu'ici sur les sous-unités α et β ne sont pas impliqués dans la spécificité de reconnaissance entre IF1 et la F_1-ATPase de levure. Trois hypothèses peuvent être émises alors :

- Nous n'avons pas muté assez de résidus pour abolir complètement l'effet inhibiteur du peptide
- Nous n'avons pas muté les bons résidus qui jouent un rôle dans la première étape de reconnaissance
- Il n'existe pas de mécanisme de reconnaissance moléculaire entre IF1 et la F_1-ATPase mais plutôt une reconnaissance mécanique entre l'enzyme et le peptide. Par reconnaissance mécanique on inclut la reconnaissance d'un motif structural spécifique sur l'IF1 ou sur l'enzyme, ou encore la reconnaissance d'une interface catalytique particulière lors de l'hydrolyse d'ATP.

Nous allons maintenant discuter ces trois points en distinguant les effets sur la reconnaissance moléculaire de ceux sur la stabilité du complexe.

Spécificité, reconnaissance moléculaire et stabilité

La spécificité d'interaction entre IF1 et la F_1-ATPase est-elle portée par la sous-unité γ Quelle que soit la mutation effectuée, IF1, à concentration saturante inhibe pratiquement totalement l'activité ATPasique. Les résidus situés sur la sous-unité α ne jouent aucun rôle dans la reconnaissance du peptide ni dans la stabilité du complexe IF1-F_1-ATPase. En ce qui concerne la sous-unité β, la double mutation β-E471K-A474E et la quadruple mutation β-T380R-S383E-E471K-A474E ont eu un effet significatif sur la valeur du k_{on} d'au moins un facteur 12. Le cas du double mutant suggère que les deux résidus E471 et A474 sont fortement impliqués dans l'étape de reconnaissance. Le cumul des quatre mutations n'ajoute d'ailleurs aucun effet sur le k_{on}, ce qui confirme que les résidus T380 et S383 ne jouent aucun rôle dans la reconnaissance du peptide par l'enzyme. Comme nous l'avons mentionné plus haut, la structure cristallographique établie par Gledhill *et al* [98] montrent l'état final de l'inhibition du complexe ATPasique et il n'est pas évident de penser que ces résidus puissent jouer un rôle dans la première étape de l'inhibition qui est celle de la reconnaissance du peptide par l'enzyme. En effet, les résidus T380 et S383 sont à proximité de la partie N-terminale d'IF1 dans le complexe inhibé. Nous verrons dans le Chapitre 4 que la partie N-terminale stabilise le complexe inhibé en s'enroulant autour de la sous-unité γ une fois que le peptide a été reconnu et fixé par l'enzyme. Aussi ces deux résidus participent à la stabilisation du complexe inhibé en interagissant avec la partie N-terminale d'IF1 (Figure 2.1). En revanche les résidus E471 et A474 sont situés vers l'extérieur de la F_1-ATPase de levure et semblent impliqués dans l'étape de reconnaissance du peptide. La Figure 2.4 montre la position des résidus α-Q416, β-D471 et β-A474 dans le complexe inhibé bovin. Plusieurs questions se posent à présent. S'il existe une interaction moléculaire spécifique entre la F_1-ATPase et IF1, il est possible que nous n'ayons pas muté les bons résidus. Les seuls résidus qui aient eu un effet sur le k_{on} sont ceux situés en C-ter de la sous-unité β et proches de l'entrée catalytique de l'ATP synthase et il est possible que les résidus responsables de la reconnaissance moléculaire IF1-F_1 soient situés encore plus en périphérie de la sous-unité β [99]. Dans ce cas, il se pourrait que les résidus E471 et A474 ne jouent un rôle que dans la reconnaissance moléculaire et leur effet ne serait que transitoire dans le mécanisme d'inhibition. En d'autres termes si la reconnaissance entre IF1 et la F_1-ATPase existe, nous pourrions envisager de muter des résidus spécifiques des ATP synthases mitochondriales mais plus éloignés d'IF1

La recherche de résidus responsables de la reconnaissance moléculaire entre l'inhibiteur et l'enzyme se base sur le fait qu'un seul ou un tout petit nombre de résidus suffisaient à rendre l'ATP synthase insensible à un inhibiteur. Nous pouvons citer à titre d'exemple les études qui ont été faites sur l'auvertine B qui ont montré que la mutation d'un seul résidu, β-R398 rendait l'enzyme insensible à cette inhibiteur[100]. Cette observation a été par la suite confirmée par la structure du complexe inhibée aurovertine B/F_1-ATPase bovin qui montrait que l'aurovertine B était en interaction avec le résidu β-R412, homologue du résidu β-R398 chez *E.coli* [65]. Une autre étude a montré que pour les ATP synthases chloroplastiques, il existait un résidu β-D83 et quelques autres résidus sur la sous-unité α qui étaient responsables de la sensibilité des ATP synthases pour la tentoxine [101]. Il serait donc peut-être intéressant de poursuivre cette étude même si la reconnaissance moléculaire d'IF1 par l'ATP synthase mitochondriale pourrait être bien plus compliquée que pour les petites molécules citées ci-dessus. En effet, la taille d'IF1 pourrait impliquer beaucoup plus de résidus qu'il n'en existe pour l'interaction aurovertine B/F_1-ATPase ou pour celle de la tentoxine avec les ATP

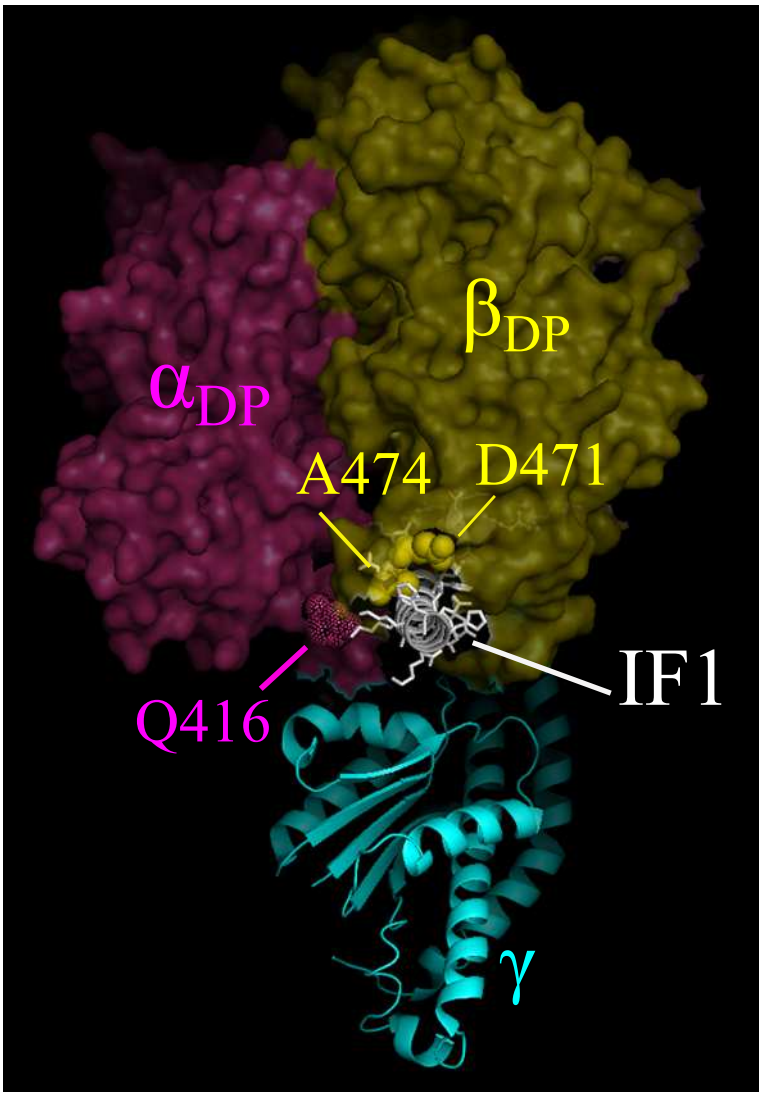


Figure 2.4: **Position des résidus α-Q416, β-D471 et β-A474 dans le complexe inhibé bovin**. [98]

synthases chloroplastiques. D'autre part, l'interaction d'IF1 avec la F_1-ATPase nécessite sans doute des changements conformationnels qui n'existent pas avec les petites molécules.

Perspectives et autres hypothèses

Le rôle de l'interface α-β. Les mutants qui ont été construits pour cette étude sont des mutants modifiés sur la sous-unité α ou modifiés sur la sous-unité β. Nous n'avons pour l'instant pas créé de mutants pour lesquels les sous-unités α et β sont simultanément modifiées. Il n'est pas exclu que la reconnaissance d'IF1 par l'enzyme se fasse par des résidus spécifiques présents sur les deux sous-unités α/β. Pour vérifier cette hypothèse nous avons projeté de faire, dans les mois à venir, des mutants modifiés sur les deux sous-unités. Pour l'instant nous avons choisi de cumuler la quadruple mutation β-T380R-S383E-E471K-A474E avec la quintuple mutation α-D-FAL-N pour former le nonuple mutant α-D-FAL-N/β-T380R-S383E-E471K-A474E sur lequel des études cinétiques d'inhibition seront faites.

Le rôle de la sous-unité γ. Dans le complexe inhibé IF1/F_1-ATPase bovin, IF1 interagit également étroitement avec la sous-unité γ. Des alignements de séquences ont aussi été faits au laboratoire montrant qu'il existe 5 résidus plus ou moins spécifiques des ATP synthases mitochondriales et à proximité d'IF1 dans le complexe inhibé bovin. Cependant la majorité de ces résidus sont situés au cœur de l'enzyme et pourraient donc difficilement jouer un rôle dans la reconnaissance spécifique de l'IF1 par l'ATP synthase.

Chapitre 3

GSDESKKL, séquence spécifique des ATP synthases mitochondriales est-elle impliquée dans l'oligomérisation des ATP synthases ?

A La dimérisation/oligomérisation des ATP synthases de mammifères et de levure

Dans la membrane interne mitochondriale, les ATP synthases sont associées en dimères et en oligomères [35]. Cette organisation particulière en dimères/oligomères participe à l'architecture de la membrane interne mitochondriale et plus précisément à la formation des crêtes mitochondriales ou cristæ. De nombreuses études ont été faites sur la dimérisation/oligomérisation des ATP synthases et certaines sous-unités impliquées dans l'interaction entre les d'ATP synthases entre elles sont déjà bien identifiées. Il existe deux interfaces de dimérisation qui impliquent notamment le pied périphérique (sous-unité 4) et les protéines e,g et k, petites protéines associées à l'ATP synthase fonctionnelle. D'autres sous-unités peuvent éventuellement venir stabiliser les structure dimériques/oligomériques de l'ATP synthase, notamment les sous-unités a, A6L et le peptide inhibiteur IF1. Différentes expériences de délétion de ces sous-unités ont montré que l'absence d'expression de ces sous-unités affectait la dimérisation/oligomérisation des ATP synthases et entraînait une modification de la morphologie des crêtes mitochondriales [37][102][39]. D'autres expériences ont rapporté que les interactions les plus importantes dans la dimérisation des ATP synthases étaient les pieds périphériques. Les sous-unités e/g et a/a6L ainsi que IF1 ne servent qu'à stabiliser les formations dimériques/oligomériques [85]. Cependant le pouvoir inhibiteur du peptide et son rôle stabilisateur dans la formation de dimères d'ATP synthases semblent être indépendants [103][104][105][85].

B Hypothèses de travail

Dans le Chapitre précédent, nous n'avons pas pu élucider la spécificité d'action d'IF1 pour les ATP synthases mitochondriales en choisissant des résidus spécifiques des ATP synthases mitochon-

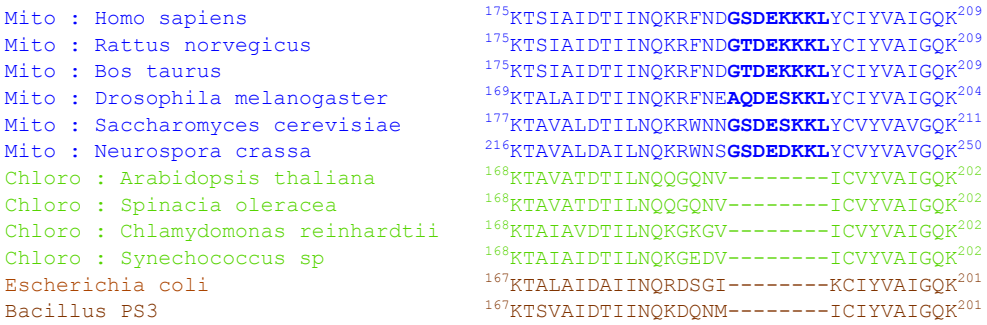


Figure 3.1: **Alignement de séquences de la sous-unité α d'ATP synthases mitochondriales et non mitochondriales**. En bleu, les ATP synthases mitochondriales ; en vert, les ATP synthases chloroplastiques ; en marron, les ATP synthases bactériennes. L'alignement de séquence des sous-unités α des différentes ATP synthases a été fait à l'aide du programme clustal W.

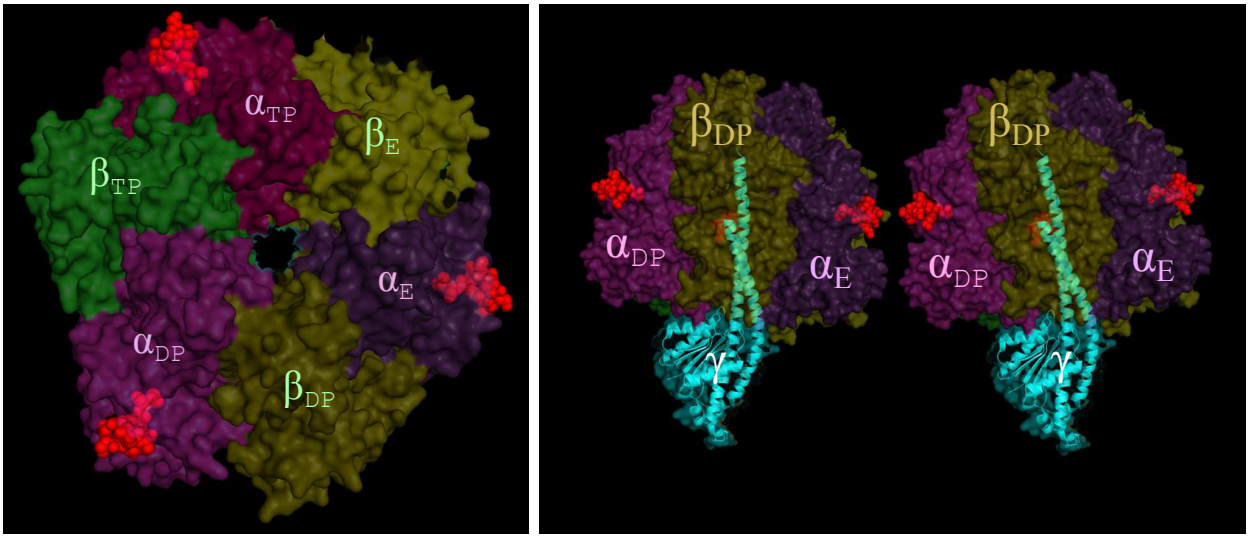
driales situés à moins de 6 Å d'IF1 dans le complexe inhibé [27][28]. Cependant, les analyses de séquences sur les différentes sous-unités de la partie F_1 ont été poursuivies. Sur la sous-unité α, il existe une séquence très conservée de 8 acides aminés "GSDESKKL" qui n'existent que dans les ATP synthases mitochondriales (Figure 3.1). Dans la structure 3D de l'ATPase de levure (pdb : 2HLD[106]), le motif GSDESKKL est située en périphérie de la sous-unité α (Figure 3.2), loin des sites catalytiques de l'enzyme et du site de fixation du peptide inhibiteur IF1. Cependant, la présence exclusive de cette séquence dans les ATP synthases mitochondriales incite à penser qu'il pourrait exister un lien entre cette séquence et IF1, et la position de celle-ci dans la partie F_1 suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la dimérisation/oligomérisation des ATP synthases par la partie F_1. Dans cette étude nous avons donc voulu savoir s'il existait un lien entre la présence de ce motif et IF1, et si ce motif jouait un rôle dans l'oligomérisation des ATPases. Pour cela nous avons supprimé par mutagenèse dirigée le motif ^{193}GSDESKKL^{200} de la sous-unité α et nous avons effectué deux sortes d'expériences :

1. Une étude cinétique a été réalisée sur particules submitochondriales (SMP) contenant des ATPsynthases déplétées en la séquence α193-200 : GSDESKKL de manière à voir si l'inhibition de l'ATPase par le peptide IF1 serait affectée.
2. Les échantillons mitochondriaux wT et Δ193-200 ont été analysés par gel non dénaturant BN-PAGE (Blue Native-PAGE) pour voir si la délétion de la séquence GSDESKKL affectait l'organisation supramoléculaire des ATP synthases.

C Résultats

I Inhibition de l'ATPase α-Δ(193-200) par l'IF1 wT

Bien que le motif ^{193}GSDESKKL^{200} soit loin du site de fixation du peptide IF1 dans l'ATPase et en supposant que le site de reconnaissance d'IF1 pourrait être différent de son site de fixation (Chapitre 2), des expériences de cinétique d'inhibition ont été réalisées sur des particules submitochondriales (SMP) contenant l'ATPase entière F_1-F_0 déplétée en la séquence Δ(193-200). La Figure 3.3 montre la constante d'inhibition apparente (k_{app}) (Figure 3.3(a)) et l'activité résiduelle



(a) (b)

Figure 3.2: **Structure tridimensionnelle de la F_1ATPase de *S.cerevisiae* (pdb : 2HLD)**. (a) Vue de haut, côté matriciel (côté OSCP). Structure 3D dans laquelle les différentes sous-unités de la partie F_1 sont représentées et dans laquelle la sous-unité γ a été supprimée. En représentation "boule" et en rouge, la séquence ^{193}GSDESKKL^{200}. (b) Vue latérale. Structure 3D de la F_1ATPase de levure montrée en mode stéréo. En représentation "boule" et en rouge, la séquence ^{193}GSDESKKL^{200}

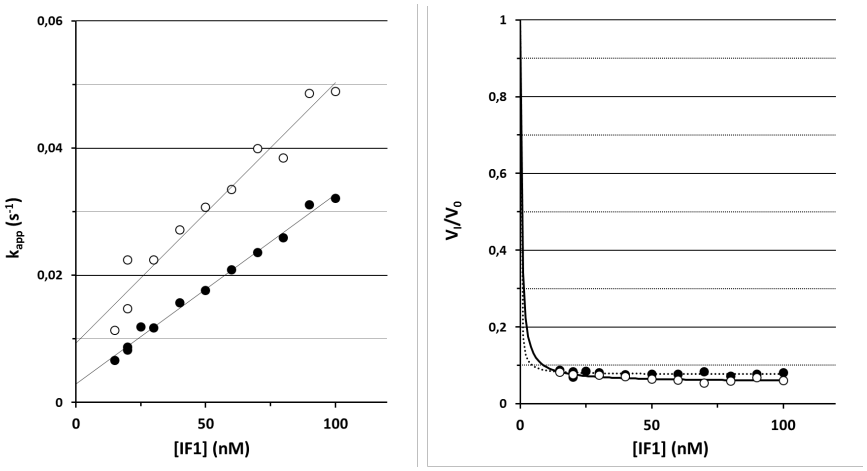
ATPasique en fonction de la concentration en IF1. La Figure 3.3 permet de déduire le paramètre cinétique k_{on} qui représente la pente de chacune des droites (wT et Δ193-200). Comparé au wT, la valeur de k_{on} est légèrement plus élevée chez le mutant Δ193-200 suggérant que le complexe inhibé se forme légèrement plus vite dans le cas du mutant. La constante thermodynamique de dissociation K_i est déduite de la Figure 3.3(b) en reportant sur l'axe des abscisses la concentration pour laquelle la moitié de l'activité est éteinte. La Figure 3.3(b) et le Tableau 3.1 montrent que les K_i du wT et du mutant Δ193-200 sont inférieurs au nM et ne sont pas mesurables. La stabilité du complexe IF1-F_1-ATPase ne semble donc pas affectée dans le cas du mutant Δ193-200.

	$\mathbf{k}_{on}$ **(M^{-1}.s^{-1})**	$\mathbf{K}_d$ **(nM)**	$\mathbf{K}_d\mathbf{k}_{on}$ **(s^{-1})**
wT	3,0 x 10^5	< 1	$< 3{,}0$ x 10^4
Δ 193-200	4,9 x 10^5	< 1	$< 4{,}9$ x 10^{-4}

Tableau 3.1: Valeurs récapitulatives des paramètres cinétiques k_{on}, K_dk_{on}, K_d

II Analyse d'échantillon par BN-PAGE

Cette partie du travail a été faite par Mehdi Lembrouk sous la direction de Claire Lemaire. Pour étudier l'organisation supramoléculaire de l'ATP synthase dans les membranes internes mitochondriales, les mitochondries ont d'abord été solubilisées dans un faible pourcentage en digitonine.



(a) (b)

Figure 3.3: **Résultats cinétiques obtenus sur le mutant α-Δ193-200 à pH 6,5**. (a) Constante apparente d'inhibition (k_{app}) en fonction de la concentration en IF1. En rond plein noir, les SMP wT ; en rond plein blanc, les SMP α-Δ193-200. Les conditions de mesure et les analyses cinétiques sont détaillées dans le "Matériels et Méthodes". (b) Rapport entre la vitesse d'hydrolyse finale (V_I) et la vitesse d'hydrolyse initiale (V_0) en fonction de la concentration en IF1. En rond plein noir, les SMP wT ; en rond plein blanc, les SMP α-Δ193-200. Les conditions de mesure et les analyses cinétiques sont détaillées dans le "Matériels et Méthodes".

Après dépôt de l'échantillon solubilisé sur gel d'acrylamide, les différents complexes contenus dans la membrane interne mitochondriale ont tout d'abord été séparés par électrophorèse en conditions non dénaturantes (BN-PAGE) puis révélés par bleu de Coommassie. Trois types d'échantillons ont été testés :

- Les mitochondries issues des souches de levures W303 (wT)
- Les mitochondries issues des souches de levures W303 ΔATP1 ; ΔATP2 complémentées par les gènes ATP1 et ATP2 contenus dans leurs plasmides respectifs pVC2 et pRS313 (wT complémentées)
- Les mitochondries issues des souches de levures W303 ΔATP1 ; ΔATP2 complémentées par les gènes ATP1Δ193-200 et ATP2 contenus dans leurs plasmides respectifs pVC_2 et pRS313 (Δ193-200)

Quelques essais ont été faits sur les différents types de mitochondries cités ci-dessus. Le résultat de cette étude ne sera pas montré ici mais simplement décrit. Après électrophorèse et coloration du gel au bleu de Coomassie, on observe trois bandes disctinctes correspondant aux dimères d'ATP synthase, aux monomères d'ATP synthase et à la partie F_1 chez le wT. Dans les échantillons où les souches ΔATP1 ; ΔATP2 ont été complémentées par des constructions plasmidiques contenant les gènes ATP1wT et ATP2wT, le profil de migration est quelque peu étrange car il ne correspond pas au profil observé dans la souche wT. En effet les supercomplexes canoniques de la chaîne respiratoire ne sont pas retrouvés mais le plus marquant est l'existence d'une traînée protéique le long du profil de migration. Cette observation se retrouve également chez le mutant Δ193-200. Ne sachant pas comment expliquer les causes de cette traînée, l'étude a pour l'instant été mise en suspens et il est malheureusement difficile et prématuré, à ce stade, de discuter du rôle éventuel du

motif ^{193}GSDESKKL^{200} dans l'organisation supramoléculaire de l'ATPase.

D Discussion et Perspectives

Les expériences cinétiques ont montré que les paramètres cinétiques calculés chez le mutant Δ193-200 ne diffèrent pas beaucoup de ceux observés pour le wT. En effet, l'affinité d'IF1 pour l'ATPase est très forte ($K_i <$ 1nM). Seul le k_{on} du mutant Δ193-200 varie légèrement. Il est 1,6 supérieur à celui du wT ce qui suggère que le site de reconnaissance du peptide sur l'enzyme est sans doute plus accessible chez le mutant qu'il ne l'est chez le wT. Il est difficile de penser que la suppression du motif ^{193}GSDESKKL^{200} situé en périphérie de la partie F_1, loin du site d'inhibition est responsable d'une augmentation du k_{on}. Cette augmentation de k_{on} sur SMP pourrait être due à une réorganisation supramoléculaire des ATP synthases dans les membranes internes mitochondriales. La position de la séquence GSDESKKL laisse à penser qu'elle pourrait être impliquée dans l'oligomérisation/dimérisation des ATP synthases. La suppression de cette séquence pourrait affecter l'oligomérisation/dimérisation des ATP synthases de manière à favoriser l'accès au site de fixation du peptide. Au vu de ces résultats cinétiques, des expériences de BN-PAGE ont été effectuées avec les mitochondries wT, wT complémentées et les Δ193-200. Hélas, les expériences obtenues ne sont pour le moment pas exploitables.

Chapitre 4

Rôle de la partie N-terminale d'IF1 dans l'inhibition de l'ATP synthase

Ce Chapitre correspond à l'article ***Andrianaivomananjaona T., Moune-Dimala M., Herga S., David V. et Haraux F., BBA Bioenergetics(2011).***

A Position de la partie N-terminale d'IF1 dans le complexe inhibé bovin IF1/MF1

I Description de la structure du complexe inhibé bovin

Dans la structure du complexe inhibé bovin [98] pdb : **2V7Q**, Figure 4.1), seuls les résidus 8-53 d'IF1 sont visibles. IF1 a été tronqué de sa partie C-terminale pour empêcher la dimérisation du peptide et ne complexer que le monomère d'IF1 avec la partie F_1 soluble de l'ATP synthase. La structure α-hélicale du peptide 22-53 est enchâssée entre les sous-unités α_{DP} et β_{DP} et sa partie N-terminale 8-21 interagit avec la sous-unité γ et la sous-unité α_E. La partie N-terminale visible 8-21 de l'IF1 bovin s'enroule autour de la sous-unité γ et peut donc jouer un rôle dans le processus d'inhibition de l'ATP synthase. Dans la structure la partie α-hélicale du peptide commence par les résidus 21-22. Dans les différentes séquences d'IF1 (Figure 4.2), un des premiers résidus strictement conservés est la phénylalalanine 22 (F22). Des études antérieures avaient déjà montré que le peptide bovin tronqué de sa partie N-terminale inhibait l'ATPsynthase [66][107][108][109][110] mais ne formait pas de complexe inhibé stable. D'autre part une étude sur modèle levure [96] montre l'importance de ce résidu (F17) dans l'inhibition de l'ATPase.

II Hypothèse de travail sur le modèle *S.cerevisiae* et démarche expérimentale

Chez la levure *S.cerevisiae*, aucun complexe IF1-F_1ATPase n'a encore été cristallisé. Pour mener notre étude, nous supposons que la partie N-terminale du peptide s'enroule aussi autour de la sous-unité γ. Pour comprendre le rôle de cette partie N-terminale dans l'inhibition, plusieurs modifications ont été réalisées. La partie N-terminale a d'une part été tronquée progressivement pour former les peptides IF1Δ1-13, IF1Δ1-14, IF1Δ1-15, IF1Δ1-16, IF1Δ1-17, et d'autre part allongée en N-terminal. Dans ce deuxième cas, deux mutants ont été créés :

- **la protéine de Fusion** constituée de 38 acides aminés (6 histidines + 32 autres acides aminés) ajoutés en N-terminal d'IF1

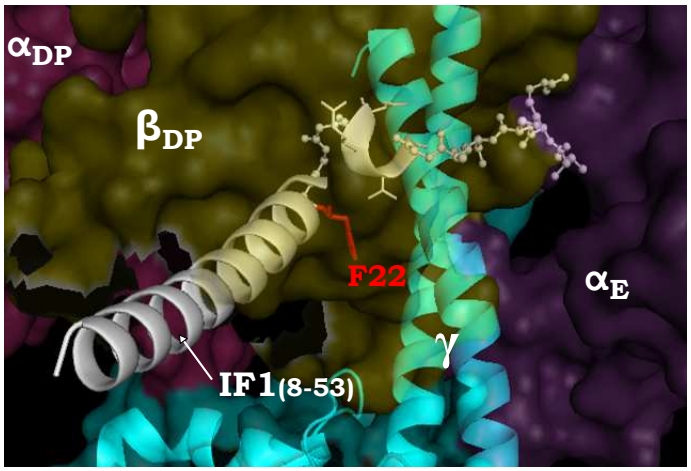


Figure 4.1: **Complexe inhibé IF1-MF1 de *B.taurus***. pdb :**2V7Q** [27]. L'image a été cadrée de façon à mettre en évidence l'interaction entre la partie N-terminale d'IF1 et la partie F_1. IF1 est représenté en blanc. La partie 8-21, enroulée autour de la sous-unité γ, est représentée en *ball and sticks* blanc. L'extrémité de la partie N-terminale interagit aussi avec la sous-unité α_E. La phénylalanine F22 marque le début de la région inhibitrice et conservée du peptide mais aussi le début de la région structurée en hélice α. La partie 23-53, α-hélicale, est représentée en *ribbon cartoon*.

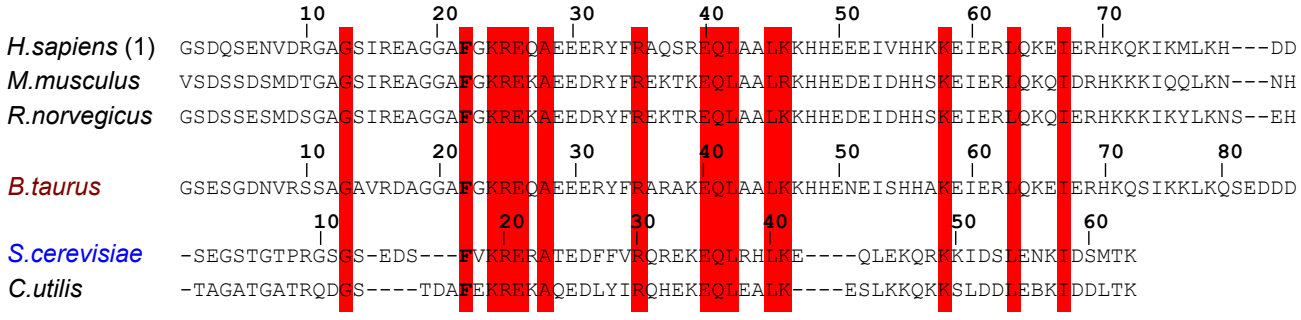


Figure 4.2: **Alignement de différentes séquences d'IF1**. L'alignement de séquence a été fait à l'aide du logiciel clustal X. Les résidus encadrés en rouge sont strictement conservés dans les différentes séquences d'IF1.

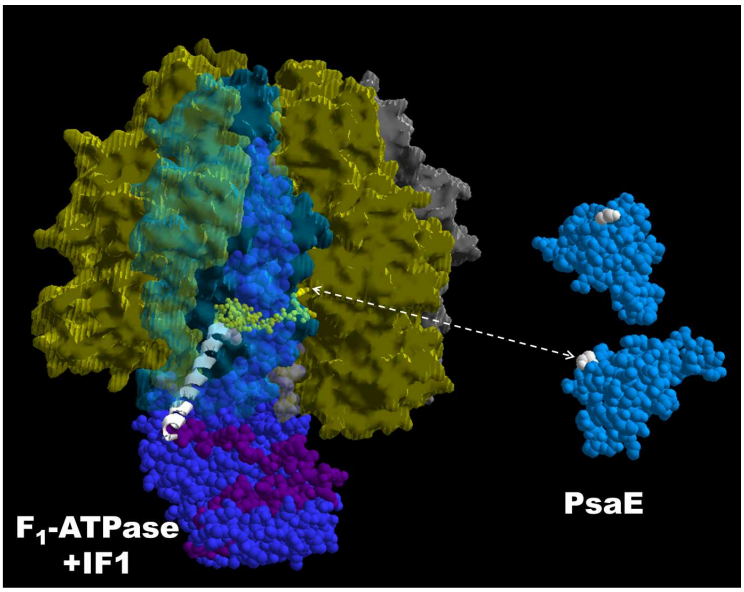


Figure 4.3: **Comparaison entre les tailles du complexe MF1-IF1 de *B.taurus* et de PsaE de *Synecchocystis sp.6803***. PsaE est montré ici sous deux angles différents (**pdb** : 1gxi). L'extrémité C-terminale de PsaE liée à la partie N-terminale d'IF1 dans la construction PsaE-IF1 est représentée en blanc, *ball and sticks*.

– **PsaE-IF1** composée d'une protéine globulaire PsaE (*Synecchocystis sp. 6803*) de 8 kDa espacée de 9 acides aminés de la partie N-terminale d'IF1 (Figure 4.3).

Enfin, dans cette étude nous réexaminerons l'importance de la phénylalanine 17 dans le pouvoir inhibiteur du peptide. En effet, dans les différentes séquences d'IF1 (Figure 4.2), on remarque que la phénylalanine est un résidu conservé. De plus, des études sur la phénylalanine 17 de *S.cerevisiae* ont conduit à conclure que muter cette phénylalanine en sérine supprimait le caractère inhibiteur du peptide. Nous vérifierons donc si cette assertion est exacte.

Il est nécessaire de déterminer l'affinité ($\frac{1}{K_i}$) des différents peptides générés pour l'ATP synthase mais aussi d'étudier les paramètres cinétiques de liaison (k_{on}). Ces données vont préciser le rôle de la partie N-terminale dans les différentes étapes de fixation du peptide sur l'ATPase : reconnaissance, fixation, et verrouillage. Nous allons donc étudier les conséquences de ces modifications sur les cinétiques d'inhibition en utilisant la partie soluble de l'ATP synthase (F_1-ATPase) et les SMP (particules submitochondriales). Nous comparerons aussi les données que nous avons obtenues avec les peptides d'IF1 délétés en N-terminal de *S.cerevisiae* avec d'autres études où l'effet de la modification de la partie N-terminale sur l'inhibition de l'ATPase a aussi été observé.

B Étude cinétique avec les différents mutants d'IF1

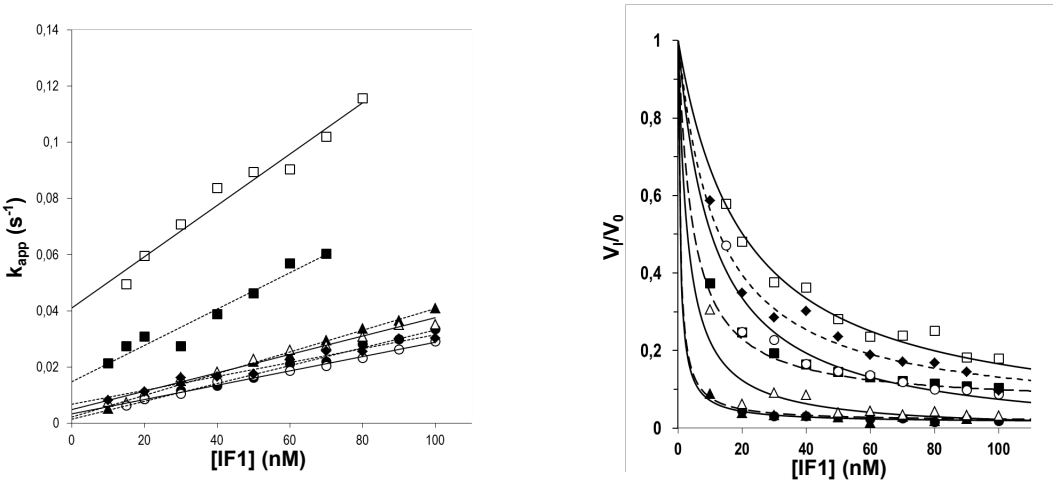
Toutes les mesures de cinétique d'inhibition ont été faites à pH 6,5, pH inférieur au pH matriciel mais qui nous permet cependant de comparer directement les valeurs de nos données avec celles de travaux antérieurs. Pour des pH plus élevés, les mesures des constantes de vitesse d'inhibition deviennent difficiles à évaluer. Les données de la littérature concernant l'inhibition de l'ATPase par

l'IF1 wT rapportent qu'à pH élevé, k_{on} diminue et k_{off} augmente [74]. Toutes les courbes comme celles montrées dans la Figure 24 sont ajustées par le modèle cinétique de premier ordre exposé dans le Matériels et Méthodes (Équation 2). Après ajout d'IF1, la vitesse d'hydrolyse d'ATP décroît à partir d'une valeur initiale V_0 pour atteindre une vitesse stationnaire V_∞. k_{app} est la constante cinétique apparente d'inhibition et sa valeur varie linéairement avec la concentration du peptide IF1. Cette relation linéaire nous donne les paramètres cinétiques k_{on}, qui représente la constante de vitesse de formation du complexe IF1/F_1-ATPase, et k_{off}, la constante de vitesse de dissociation du complexe IF1/F_1-ATPase. k_{on} est donné par la pente de la droite $f([IF1]) = k_{app}$ et k_{off} par l'ordonnée à l'origine. Le degré d'inhibition représenté par l'expression $\frac{V_\infty}{V_0}$ a été reporté sur la Figure 4.4(b) en fonction de la concentration en IF1. Il donne accès a la constante thermodynamique K_i. Le produit $K_i.k_{on}$ donne une valeur de k_{off} plus fiable que celle représentant l'ordonnée à l'origine et sera la valeur considérée.

I Résultats obtenus sur F_1 isolé

Données cinétiques concernant les IF1Δ1-13 → IF1Δ1-17. Les résultats obtenus (Figure 4.4(a)) montrent que par rapport aux données obtenues pour IF1 wT (•), le k_{on} n'est pas affecté lorsque les 13 (▲) ou 14 premiers (△) acide aminés sont délétés. (Tableau 4.1). La délétion des 2 résidus suivants entraîne une augmentation du k_{on} d'un facteur 2 à 3. La Figure 4.4(b) montre que pour une concentration de 20 nM d'IF1 wT l'activité ATPasique est inhibée au maximum. Pour l'IF1 wT, et l'IF1 Δ1-13, le K_i est inférieur à 1 nM, ce qui montre que l'affinité du peptide pour l'enzyme ne semble pas affectée. L'affinité du peptide pour l'ATPase commence à être affectée lorsqu'on délète les 14 premiers résidus. En effet, plus on délète la partie N-terminale du peptide plus le K_i augmente. Les valeurs des différents paramètres cinétiques k_{on}, k_{off} ainsi que les valeurs de la constante de dissociation K_i sont reportées dans le Tableau 4.1. Le k_{off} de l'IF1 wT et de l'IF1 Δ1-13 ne peut pas être calculé car la valeur de K_i est indéterminée.
La suppression successive des résidus de la partie N-terminale induit une augmentation du k_{off} (wT :9,6±2,5. $10^{-4}s^{-1}$; Δ1-16 :1,9±0,6. $10^{-2}s^{-1}$). L'effet maximal observé sur les paramètres cinétiques et K_i apparaît lorsqu'on délète le 16 premiers résidus. Le K_i est augmenté de 20 fois et le k_{off}, plus de 100 fois dans le cas de l'IF1 Δ1-16. Cet effet est bien plus important que celui rapporté pour le k_{on} (3 fois supérieur à $k_{on\ wT}$). Ceci suggère que plus l'IF1 est délété en sa partie N-terminale, plus l'IF1 semble se dissocier de l'ATPase et plus son affinité pour l'ATPase diminue, ce qui montre que la partie N-terminale joue un rôle important dans la stabilisation du complexe inhibé.

L'instabilité de l'inhibition concernant les IF1Δ1-15 → IF1 Δ1-17 Dans le cas des IF1 wT, IF1 Δ1-13, IF1 Δ1-14, la F_1-ATPase, une fois inhibée, reste complètement inactive. En ce qui concerne les IF1 Δ1-15 et IF1 Δ1-16, l'inhibition de la F_1-ATPase n'est pas stable. Après injection des peptides IF1Δ1-15 et IF1 Δ1-16, la F_1-ATPase est inhibée dans un premier temps, puis l'inhibition semble être levée après quelques minutes (Figure 4.5). Cette phase de réactivation semble plus prononcée dans le cas de l'IF1 Δ1-16. Les mesures et l'analyse des résultats avec ces mutants ont été particulièrement difficiles car l'inhibition étant rapide et la phase d'inhibition relativement courte, il nous a été difficile de calculer les constantes de vitesse d'inhibition k_{app} pour les concentrations en IF1 élevées (>50 nM). Pour pouvoir observer malgré tout cette phase d'inhibition, les concentrations en F_1-isolé ont dû être augmentées pour des concentrations en IF1 supérieures à 50 nM. Les valeurs reportées dans le Tableau 4.1 ont été analysées en coupant la



(a) (b)

Figure 4.4: **Constante apparente de vitesse d'inhibition (a) et activité hydrolytique résiduelle (b) en fonction de la concentration des IF1 modifiés obtenus**. Les conditions de mesure et d'analyse des fits sont détaillées dans le Matériels et méthodes section J. yIF1 wT(- -●- -) ; yIF1Δ1-13 (- -▲- -) ; yIF1Δ1-14 (–△–) ; yIF1Δ1-15 (- -■- -) ; yIF1Δ1-16 (–□–) ; Fusion (- -♦- -) ; PsaE-IF1 (–○–).

cinétique avant le début de la phase lente de réactivation.

L'inhibition de l'ATPase par L'IF1 Δ1-17 montre les mêmes signes d'instabilité que celle des IF1 Δ1-15 et IF1 Δ1-16 (résultats non montrés) c'est à dire que l'inhibition par ce peptide a aussi une phase d'inhibition et une levée d'inhibition. Cependant la phase d'inhibition semble plus courte que celle qui a été observée pour les deux précédents mutants. Hélas, ces derniers résultats n'ont pas pu être approfondis car une trop faible quantité de ce peptide tronqué a été obtenue. Quelques explications concernant la phase de réactivation seront données dans la section C.

Les propriétés inhibitrices d'IF1 F17S. Pour pouvoir faire une étude sur l'importance du résidu F17 dans le pouvoir inhibiteur du peptide, le mutant F17S a été produit. Ichikawa *et al.*[96] ont montré en 2001, que même fixé sur l'enzyme, le peptide F17S n'inhibait pas l'activité ATPasique à pH 6,5. Dans notre étude, nous avons voulu vérifier l'absence de pouvoir inhibiteur de l'IF1 F17S et nous avons trouvé que l'IF1 F17S continuait bien à inhiber l'activité ATPasique mais avec une affinité au moins 60 fois plus faible que celle du sauvage (K_i = 60 nM avec le F_1 isolé). De même que pour les peptides IF1 Δ1-15 et IF1 Δ1-16, l'inhibition est très rapide avec l'IF1 F17S et la mesure des constantes de vitesse k_{app} est difficile. La valeur de k_{on} est proche de celle estimée pour IF1 Δ1-15 et IF1 Δ1-16. Elle est 2,5 fois supérieure (7 x 10^5) à celle du wT. Le k_{off} est plus de 100 fois supérieur à celui du wT, aussi comme pour les peptides tronqués IF1 Δ1-15 et IF1 Δ1-16, le k_{off} est modifié de manière plus importante que le k_{on} (Figure 4.6, Tableau 4.1). Comme ce résultat contredisait celui de la littérature, nous avons voulu exclure le fait que cette inhibition soit causée par des effets non spécifiques dû à un contaminant non protéique présent dans notre préparation (sels, TCA, etc...). Il a fallu, pour cela, dégrader l'IF1 F17S par digestion trypsique et vérifier que

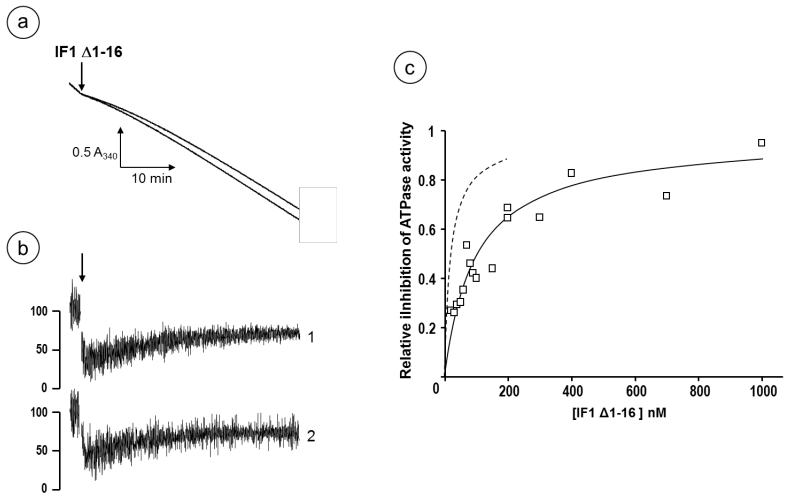


Figure 4.5: **Réactivation partielle de l'activité ATPasique suivant l'inhibition d'IF1 Δ1-16**. Figure extraite de [91] (a) La cinétique d'inhibition de l'activité ATPasique montre la courte phase d'inhibition suivie de la phase lente de réactivation. Les courbes 1 et 2 montrent la même courbe d'inhibition à deux concentrations d'IF1. Courbe 1 : 40 nM IF1 Δ1-16 ; courbe 2 : 20 nM IF1 Δ1-16. (b) Dérivées premières représentant les vitesses instantanées d'hydrolyse d'ATP normalisée à la vitesse initiale. (c) Inhibition relative de l'activité ATPasique estimée après la phase de réactivation. La courbe en pointillé représente l'inhibition relative de l'activité ATPasique obtenue directement après la phase d'inhibition. Celle-ci a pu être déterminée car elle correspond au minima obtenus dans les dérivées premières en (b).

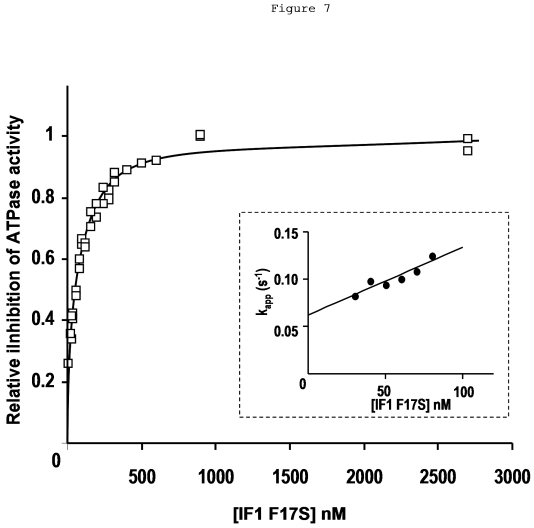


Figure 4.6: **Inhibition relative de l'activité ATPasique en fonction de la concentration en IF1 F17S sur F_1-ATPase**. Figure extraite de [91] Encadré : Constante apparente de vitesse d'inhibition (k_{app}) en fonction de la concentration en IF1. k_{on} = 7,2 x 10^5 $M^1.s^{-1}$; K_i = 56,2 nM

la préparation d'IF1 F17S n'avait plus d'effet inhibiteur, ce qui fut le cas.

Les peptides Fusion et PsaE-IF1. Comme il l'a été décrit dans la section I, IF1 pénètre dans la F_1-ATPase en interagissant avec la sous-unité γ par son extrémité N-terminale 8-22. Attacher un peptide (Fusion de 38 acides aminés) ou une protéine à structure globulaire (PsaE) à cette extrémité peut avoir des conséquences substantielles sur la fixation du peptide à la F_1ATPase. De façon surprenante, les peptides d'IF1 rallongés en N-terminal d'une séquence de 38 acides aminés ou d'une protéine globulaire ne diminuait pas beaucoup le k_{on}, donc la reconnaissance du peptide raccordé. En effet les résultats montrent que le $k_{onFusion}$ et $k_{onPsaE-IF1}$ ne sont diminués que de 20%. En revanche, la présence d'un raccord en N-terminal modifie quelque peu la stabilité du complexe inhibé car pour ces peptides, les K_i sont 10 à 12 fois supérieurs (Fusion) à celui du wT ($K_{iPsaE-IF1}$: 7,9 nM ; $K_{iFusion}$: 12,3 nM) et les k_{off} sont 10 à 20 fois supérieur à celui du wT (Tableau 4.1). L'ensemble de ces résultats est très important pour la suite des interprétations concernant le rôle de la partie N-terminale, car l'ajout d'un fragment peptidique ou protéique en N-terminal n'affecte pas le k_{on} mais affecte nettement le K_i.

II Résultats obtenus sur F_1F_0-ATPase entière (SMP)

Des cinétiques d'inhibition ont également été faites sur des SMP qui contiennent des ATP synthases entières (F_1F_0-ATPases). Pour le wT, le k_{on} est diminué de 30 % sur SMP. On s'attend donc à avoir des valeurs de k_{on} plus faibles sur SMP, pour les mutants, mais on verra dans le paragraphe suivant que ce n'est pas le cas. Les valeurs de K_i ont diminué sur SMP pour tous les mutants sauf dans le cas de l'IF1 F17S où le K_i augmente près de 3,5 fois par rapport à la valeur obtenue sur F_1-ATPase. Ces modifications sont vraisemblablement dues au pied périphérique de l'ATP synthase ou encore à l'organisation supramoléculaire de l'enzyme.

Peptide	$\mathbf{k}_{on}$ **($M^{-1}.s^{-1}$)**	$\mathbf{K}_i$ **(nM)**	$\mathbf{K}_i.\mathbf{k}_{on}$ **(s^{-1})**
IF1 wT	3,2±0,3 x 10^5	<1	n.d
IF1 Δ1-13	3,9±0,2 x 10^5	<1	n.d
IF1 Δ1-14	3,3±0,3 x 10^5	2,9±0,5	9,6±2,5 x 10^{-4}
IF1 Δ1-15	6,5±0,9 x 10^5	4,4±0,7	2,9±0,9 x 10^{-3}
IF1 Δ1-16	9,1±1,8 x 10^5	20,3±2,1	1,9±0,6 x 10^{-2}
F17S	7,2±1,4 x 10^5	56,2±3,7	4,1±2,5 x 10^{-2}
Fusion	2,5±0,2 x 10^5	12,3±2,5	6,7±1,4 x 10^{-3}
PsaE-IF1	2,6±0,1 x 10^5	10,9±1,5	2,8±0,5 x 10^{-3}

Tableau 4.1: [
Paramètres cinétiques obtenus sur l'ATPase isolée (F_1-ATPase) après inhibition de l'activité hydrolytique par IF1 et ses dérivés]Paramètres cinétiques obtenus sur l'ATPase isolée (F_1-ATPase) après inhibition de l'activité hydrolytique par IF1 et ses dérivés.

Données cinétiques concernant les IF1Δ1-13 → IF1Δ1-17. Dans le complexe entier de l'ATP synthase, la partie soluble F_1 est associée au rotor F_0 par le pied central $\gamma\delta\varepsilon$. La présence de la membrane et du pied périphérique pourrait alors diminuer l'accessibilité d'IF1 à son site de fixation, ce qui est suggéré par la valeur de k_{on} du wT, diminuée de 20 à 30% sur SMP. Comme pour l'étude sur F_1 isolé, le k_{on} de L'IF1 Δ1-13 est proche de celui du wT (Tableau 4.2). À partir de la délétion des 14 premiers résidus, le k_{on} commence aussi à augmenter mais de façon drastique dans le cas des SMP. Comparé à l'étude sur F_1 isolée où la délétion des 14 à 16 premiers résidus augmentait le k_{on} d'un facteur 2 à 3, l'étude sur SMP montre des k_{on} qui sont 4 à 9 fois supérieurs à la valeur du wT. On aurait pu penser que comme pour le wT, toutes les valeurs de k_{on} soient diminuées sur SMP mais ce n'est pas le cas. Nous verrons ce que signifie cette augmentation soudaine de k_{on} dans la section C. En ce qui concerne les valeurs de K_i, leurs valeurs sont indéterminées car inférieures au nM dans les cas du wT et des mutants Δ1-13 et Δ1-14. Elles n'ont pu être déterminées qu'à partir de l'IF1 Δ1-15. Et tout comme il l'a été montré sur F_1 isolée, l'augmentation de K_i en fonction du nombre de résidus délétés en N-terminal traduit l'instabilité du complexe inhibé lorsque la partie N-terminale est délétée.

Les propriétés inhibitrices d'IF1 F17S. Sur SMP, le k_{on} de l'IF1 F17S est très proche de celui obtenu pour l'IF1 wT ($k_{on\ F17S}$: 2,4±0,5 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$). Les valeurs de k_{on} obtenues sur F_1 isolée et sur SMP montrent bien que l'IF1 F17S est reconnu par l'enzyme et qu'il inhibe l'activité hydrolytique. Cependant les valeurs de k_{off} (k_{off} : 4,4±1,3 x 10^{-2}) et de K_i (185 nM) montre que le complexe ATPase-IF1 F17S n'est pas stable et que le peptide peut se dissocier facilement de son site de fixation (Figure 4.7, Tableau 4.2).

Les peptides Fusion et PsaE-IF1. Sur SMP, les résultats concernant le peptide Fusion contredisent quelque peu les valeurs des paramètres cinétiques qui ont été obtenues sur F_1 isolée. Tout d'abord le k_{on} est 4 fois supérieur à celui du wT (k_{on} : 8,9 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$). L'ajout de la séquence de 38 acides aminés semblent favoriser la reconnaissance moléculaire entre l'enzyme et le peptide Fusion. La valeur de $K_{iFusionSMP}$ semble aussi être réduite et atteint une valeur qui est inférieur au nM. Contrairement au F_1 isolé, le peptide Fusion semble se fixer plus rapidement sur l'enzyme

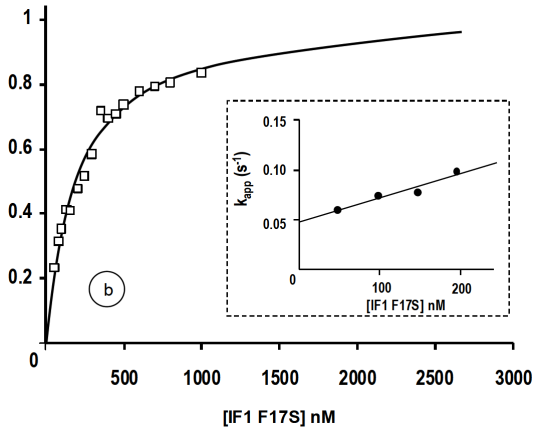


Figure 4.7: **Inhibition relative de l'activité ATPasique en fonction de la concentration en IF1 F17S sur SMP.** Encadré : Constante apparente de vitesse d'inhibition (k_{app}) en fonction de la concentration en IF1. k_{on} = 2,4 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$; K_i = 185 nM.

Peptide	$\mathbf{k_{on}}$ **($M^{-1}.s^{-1}$)**	$\mathbf{K_i}$ **(nM)**	$\mathbf{K_i.k_{on}}$ **(s^{-1})**
IF1 wT	2,2±0,2 x 10^5	<1	n.d
Δ1-13	2,7±0,3 x 10^5	<1	n.d
Δ1-14	8,1±0,5 x 10^5	<1	n.d
Δ1-15	17,0±1 x 10^5	1,8±0,2	3,1±0,5 x 10^{-3}
Δ1-16	19,2±1,9 x 10^5	8,1±1,9	1,6±0,5 x 10^{-2}
F17S	2,4±0,5 x 10^5	185±14	4,4±1,3 x 10^{-2}
Fusion	8,9±1,3 x 10^5	0,8±0,2	7,1±5,8 x 10^{-4}
PsaE-IF1	1,7±0,1 x 10^5	6,4±0,8	1,1±0,2 x 10^{-3}

Tableau 4.2: **Paramètres cinétiques obtenus sur l'ATPase entière (F_1F_0-ATPase) après inhibition de l'activité hydrolytique par IF1 et ses dérivés.**

(k_{onF_1} : 2,5 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$; k_{onSMP} : 8,9 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$) et le complexe inhibé F_1F_0ATPase-IF1 Fusion semble être plus stable que le complexe F_1ATPase-IF1 Fusion (K_{iF_1} : 12,3 nM ; K_{iSMP} : inférieur au nM). Ces données sont surprenantes car il semblerait que l'ajout de ces 38 acides aminés favorise l'inhibition de l'ATPase. Pour PsaE-IF1, les valeurs des paramètres cinétiques sont moins surprenantes. Le k_{on} est proche de celui du wT (k_{onwT} : 2,2 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$; $k_{onPsaE-IF1}$: 1,7 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$). Le K_i de PsaE-IF1 est au moins 6 fois supérieur à celui du wT. Dans le cas de PsaE-IF1, les données obtenues sur SMP semblent confirmer les résultats qui ont été obtenus sur F_1 isolée. L'ajout d'une protéine globulaire de 8 kDa ne modifie pas l'étape de reconnaissance mais semble diminuer la stabilité de l'enzyme.

C Discussion et conclusion

I Conséquences des modifications de la partie N-terminale sur les propriétés inhibitrices d'IF1

Le cas des IF1 tronqués. La position de la partie N-terminale d'IF1 au cœur du complexe inhibé suggère que cette partie est la première qui se présente à l'enzyme lors de la fixation du peptide à l'enzyme. Les expériences menées ici nous ont permis d'avoir, pour chacun des mutants, des informations précises sur la constante de vitesse de formation du complexe k_{on} et sur $\frac{1}{K_i}$, l'affinité du peptide pour l'enzyme. Les expériences sur F_1 isolé montrent que la délétion des 14 premiers acides aminés ne modifie pas la valeur de k_{on} et augmente quelque peu la valeur de K_i. Ce premier résultat indique que les 14 premiers résidus ne jouent aucun rôle dans la reconnaissance du peptide par l'ATP synthase. En revanche lorsqu'on délète les 2 résidus suivants, 15 et 16, des changements sur le k_{on} et sur le K_i commencent à apparaître. Le k_{on} augmente 2 à 3 fois et K_i près de 4 à 20 fois. Enlever les 15 et 16 premiers résidus montre que la fixation du peptide pourrait être encore bien plus rapide et que ces résidus gênent la première étape de fixation du peptide : la phase de reconnaissance. Si ces résidus semblent gêner la reconnaissance du peptide par l'ATPase, les K_i des mutants délétés en N-terminal montrent que les résidus 14 à 16 sont toutefois nécessaires à la stabilisation du complexe inhibé. De plus, quelques résultats surprenants et difficiles à expliquer sont survenus avec ces peptides tronqués. Deux phases ont été observées : une phase d'inhibition suivie d'une phase de réactivation de l'enzyme. Plusieurs explications concernant l'origine de cette cinétique biphasique peuvent être données :

- La conversion lente de l'enzyme vers une autre forme dont l'affinité pour IF1 est plus faible peut expliquer les 2 K_i observés ($K_{i(1)} = 20$ nM, $K_{i(2)} = 100$ nM)
- Le peptide peut être dégradé après avoir interagi avec l'enzyme
- Le peptide peut se dégrader lui même car il n'est pas stable
- Le peptide peut être adsorbé sur les parois des cuves de mesure

Les résultats obtenus pour l'IF1Δ1-17 montrent que ce dernier est instable. Tout d'abord la concentration du peptide purifié est tellement faible qu'elle ne peut pas être détectée par simple dosage calorimétrique. L'inhibition de l'activité hydrolytique par l'IF1 Δ1-17 peut s'avérer être différente à chaque injection d'une quantité arbitraire d'IF1Δ1-17. L'ajout d'IF1Δ1-17 peut être sans effet sur l'activité ATPasique ou peut entraîner une cinétique d'inhibition biphasique. On peut expliquer ces observations par le fait que plus on délète la partie N-terminale vers le résidu 17, plus le peptide serait instable, c'est-à-dire qu'il pourrait être dénaturé, plus sensible à son environnement en solution ou à la dégradation par les protéases.

Dans le complexe inhibé bovin, les acides aminés G20 et A21 précédant directement la phénylalanine 22 n'interagissent pas directement avec la sous-unité γ. La sous-unité γ n'est donc pas impliquée directement dans la stabilisation finale du complexe inhibé. Chez la levure, il existe un complexe inhibé IF1-F_1-ATPase qui a été résolu par radiocristallographie mais qui n'a hélas pas encore été publié (communication personnelle : Graham Robinson, John Walker). Contrairement à la partie N-terminale d'IF1 bovin, celle de levure n'est pas structurée mais s'enroule aussi autour de la sous-unité γ. Les équivalents des résidus G20 et A21 chez *S.cerevisiae* sont les résidus D15 et S16 qui ne semblent pas non plus interagir avec la sous-unité γ (communication personnelle : Graham Robinson).

Sur SMP, les effets des délétions sont presque équivalents à ceux qui ont été observés sur F_1 isolé. L'architecture de l'ATP synthase entière est toutefois susceptible de rendre le site de fixation pour

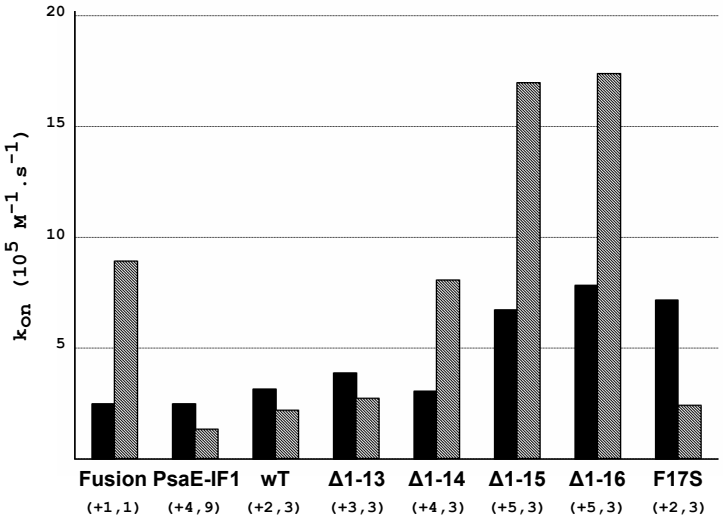


Figure 4.8: **Comparaison des valeurs de k_{on} obtenus pour chaque peptide wT et modifiés sur F_1 isolée et sur SMP**. La hauteur des barres correspondent aux valeurs k_{on} obtenus sur F_1 isolée et sur SMP. Les barres noires correspondent aux valeurs de k_{on} obtenues sur F_1 isolée. Les barres grises correspondent aux valeurs de k_{on} obtenues sur SMP. En abscisse est noté l'ensemble des peptides utilisés pour cette étude. En dessous de chaque peptide est noté entre parenthèses, le nombre de charges électriques élémentaires par molécule de peptide (q). (q) est calculé d'après la formule :
$q = \sum[\frac{n_i}{1+10^{6,5-pK_i}} - \sum \frac{n_j}{1+10^{pK_i-6,5}}]$
i se réfère aux résidus basiques : Nter, Arg, Lys, His
j se réfère aux résidus acides : Asp, Glu, Cter

IF1 un peu plus difficile d'accès, c'est probablement pourquoi les valeurs de k_{on} de l'IF1 wT et de l'IF1 Δ1-13 sont diminuées de 30% sur SMP. Les valeurs de k_{on} des IF1 Δ1-14, Δ1-15, Δ1-16 augmentent cependant anormalement, laissant penser que ces IF1 modifiés se lient beaucoup plus rapidement sur l'ATP synthase entière qu'ils ne se liaient sur la F_1-ATPase seule. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la charge électrique globale d'IF1, qui est positive, augmente avec la suppression des résidus acides E14 et D15. Ainsi, IF1 wT possède 2,3 charges par molécule, IF1 Δ1-14, 3,3 charges par molécule, Δ1-15, 4,3 charges par molécule et enfin Δ1-16, 4,3 charges par molécule. Les calculs de charges sont détaillés dans la légende de la Figure 4.8. Ces molécules chargées positivement peuvent s'accumuler à proximité de la membrane qui, elle, est chargée négativement. La charge nette portée par les IF1 wT et IF1 Δ1-13 n'est pas suffisante pour contrebalancer les effets stériques de l'environnement membranaire. L'effet électrostatique créé par la perte de résidus acides sur les IF1 Δ1-14, Δ1-15, Δ1-16 est plus important et peut surpasser cet effet stérique.

La phénylalanine F17S est-elle si importante pour l'inhibition de l'ATPase ? Le résidu 17 est l'un des résidus les plus conservés dans la séquence d'IF1 (Figure 4.2). Il constitue une référence car il est le point initial de la séquence conservée et inhibitrice d'IF1. Dans le complexe inhibé bovin, la phénylalanine F22 constitue aussi la limite structurale entre la partie N-terminale

non structurée s'enroulant autour de γ et la séquence α-hélicale inhibitrice du peptide. Dans le complexe inhibé de *S.cerevisiae*, la phénylalanine F17 serait aussi un des premiers résidus constituant l'hélice α d'IF1 (communication personnelle : Graham Robinson). Ichikawa *et al* s'étaient déjà intéressées à ce résidu très conservé et l'avaient muté en sérine [96]. Cette mutation avait rendu le peptide non inhibiteur. Dans notre étude, la délétion des 17 premiers résidus n'affectait pas le pouvoir inhibiteur propre du peptide. Cependant aucune conclusion n'a pu en être déduite du fait que le peptide délété de ses 17 acides aminé s'avérait être instable. C'est pourquoi nous avons repris l'étude de l'IF1 F17S. Dans notre cas, le peptide F17S inhibe aussi bien la F_1-ATPase que la F_1F_0-ATPase (SMP). Ce résultat contradictoire avec ceux préalablement publiés peut s'expliquer par une différence de préparation du peptide. Ichikawa *et al* [96] ont incubé la préparation de SMP avec IF1 dans du tampon Tris-maléate à différents pH (6,5, 7,2 et 8,0), puis ont dilué 50 fois cette préparation dans un tampon Tris-SO_4 pH 8,0 pour mesurer les activités hydrolytiques résiduelles. En plus de l'effet de dilution, le pH élevé diminue fortement les valeurs de k_{on} et augmente la valeur de K_i [74]. Ces deux observations associées à la nature de la mutation peuvent expliquer cette différence d'inhibition entre nos deux peptides F17S. Dans notre étude, nous n'avons pas incubé le mélange SMP-IF1 avant de mesurer l'activité hydrolytique, mais nous avons réalisé les mesures d'hydrolyse d'ATP en temps réel à pH 6,5, ce qui explique vraisemblablement les différences observées.

Pour conclure, le résidu 17 (22 bovin) n'est pas un résidu essentiel à l'attribution du caractère inhibiteur d'IF1, cependant il joue un rôle essentiel dans la stabilisation du complexe inhibé. En effet, d'après la structure inhibée bovine, ce résidu interagit avec les sous-unités, β_{DP}, β_{TP} et γ et plus particulièrement avec les résidus β_{DP}A389, β_{TP}I390, β_{TP}L391 et γI16.

Cas des peptides Fusion et PsaE-IF1. L'ajout d'un raccord protéique en N-terminal d'IF1 a apporté quelques informations supplémentaires sur la fonction de la partie N-terminale dans l'inhibition du peptide et nous permet de décortiquer les étapes de présentation du peptide à l'ATP synthase. L'étude de ces mutants modifiés en N-terminal par ajout d'un raccord protéique a tout d'abord été faite sur F_1 isolé puis sur SMP. Sur F_1 isolé on a pu observer que le k_{on} du peptide Fusion et celui de PsaE-IF1 était diminué de 20 %. Ce résultat fut surprenant car il montrait que l'ajout d'un raccord en N-terminal, même globulaire, n'empêchait d'inhiber l'activité ATPasique. En revanche nous avons vu que la valeur de K_i avait sensiblement augmenté pour le peptide Fusion et PsaE-IF1, soit au moins d'un facteur 10. En comparant le K_i avec celui des IF1 délétés en N-terminal, on s'aperçoit que sa valeur est comprise entre celle de l'IF1Δ1-15 et celle de l'IF1Δ1-16. Finalement, il n'est pas surprenant que l'ajout de protéine en N-terminal ou la suppression de résidu en N-terminal diminue la stabilité du complexe de la même manière puisque ces deux modifications perturbent toutes deux l'interaction avec la sous-unité γ. Ces premières données nous ont donc montrés que le peptide Fusion et PsaE-IF1 était capables de se fixer aussi vite sur l'enzyme que l'IF1 wT, mais que la stabilité du complexe inhibé avait sensiblement diminuée suite à l'ajout de ce raccord.

Nous avons ensuite poursuivi cette étude sur SMP. Pour PsaE-IF1, il n'y eut rien d'étonnant dans les valeurs des paramètres cinétiques qui suivaient globalement les observations que nous avions faites avec la F_1 isolée. Les résultats les plus inattendus ont été ceux obtenus avec le peptide Fusion. Le Tableau 4.2 montre que la valeur de k_{on} est 4 fois supérieure à celle du wT et que le K_i est inférieur au nM. Cette augmentation de k_{on} et cette diminution de K_i sont difficilement explicables, même par la charge globale portée par le peptide. Il est possible que l'IF1 Fusion possède quelques résidus ou une séquence qui favorisent l'étape de reconnaissance du peptide sur l'ATP synthase entière agissant comme un lasso moléculaire. Nous avons du mal à comprendre comment un raccord

de 38 acides aminés pourrait favoriser l'action d'IF1 mais nous pouvons émettre l'hypothèse que le peptide Fusion pourrait se lier transitoirement sur une des sous-unités de la partie F_0 comme le pédoncule latéral ou le rotor F_0 comme point d'ancrage mais il pourrait tout aussi bien se lier sur les sous-unités stabilisatrices d, f, h, i de l'ATP synthase ou sur les sous-unités e, g et k, impliquées dans la dimérisation des ATP synthases.

II Comparaisons de données et apport de la technique

L'effet des délétions de la partie N-terminale de l'IF1 bovin ou de levure sur ses propriétés inhibitrices avaient déjà fait l'objet de plusieurs études dont les résultats sont souvent contradictoires et discutables [66][96][107][108][109][110] . Cette étude semble avoir été réinitiée par l'équipe de John Walker puisque une étude similaire à la nôtre sur l'effet de la délétion de la partie N-terminale de l'IF1 bovin à été publiée peu après notre étude. Nous allons dans cette section, comparer nos données à des données plus ou moins récentes extraites de la littérature. Il sera aussi question ici de discuter des nouvelles données structurales concernant le complexe IF1/MF1 de *S.cerevisiae* qui ont été montrées lors du dernier congrès EBEC 2010, Varsovie et qui sont toujours désespérément en attente de publication.

Études similaires sur la partie N-terminale d'IF1 et discussion sur les valeurs de K_i obtenues dans la littérature

L'ensemble des publications antérieures à la nôtre rapportent que la délétion de la partie N-terminale n'affecte pas le caractère inhibiteur du peptide. Pour être plus précis, les délétions faites en amont de la phénylalanine 17 (22 chez *B.taurus*), point de référence dans la séquence du peptide IF1, n'affectent pas le pouvoir inhibiteur du peptide. Les délétions qui incluent les résidus 16 (*S.cerevisiae*) ou 21 (*B.taurus*) donnent des résultats contradictoires dans quelques publications [109][110]. Ces IF1 tronqués (*B.taurus*, *C. utilis*, *S. cerevisiae* et *R. norvegicus*) inhibent toujours l'activité ATPasique même si parfois ils le font avec une faible affinité. Dans d'autres publications les mêmes délétions peuvent rendre le peptide non inhibiteur [66]. Ces résultats diffèrent probablement par la préparation de l'échantillon de mesure (SMP/F_1-IF1). En effet dans certaines études, la mesure d'activité hydrolytique se fait directement sans étape d'incubation. Dans d'autres, l'enzyme est d'abord incubé avec IF1 avant que le mélange d'incubation soit dilué dans le milieu réactionnel de l'enzyme pour les mesures d'activité. Ce dernier protocole peut certainement conduire à un relargage du peptide dans le milieu réactionnel et donc à une surestimation du K_i et de k_{off} dans le cas de l'étude des peptides tronqués. Nous allons comparer à présent les données qui sont directement comparables avec les nôtres car elles utilisent les mêmes procédés expérimentaux c'est-à-dire une mesure directe d'activité sans dilution du mélange enzyme-peptide. Prenons le cas de l'IF1 Δ1-16 qui présente un $K_i = 20$ nM dans notre étude chez *S.cerevisiae* et un $K_i = 4$ μM pour l'étude du peptide 17-41 faite à un même pH (6,5) par le laboratoire de Schuster sur le modèle bovin [109]. Ces différences de K_i peuvent être expliquées par le fait que notre peptide 17-63 de levure est peut-être plus affin pour la F_1-ATPase de *S.cerevisiae* que ne l'est le peptide 17-41 et les résidus 42-63 jouent peut-être eux aussi un rôle important dans les propriétés de fixation ou de stabilisation du peptide à la F_1-ATPase.

Même si d'autres études ont été faites sur le rôle de la partie N-terminale, notre étude est la première qui utilise des approches cinétiques aussi précises. Elle renseigne sur le paramètre k_{on} (constante de vitesse de formation du complexe IF1/MF1), le K_i (la constante thermodynamique

d'affinité du peptide pour la F_1-ATPase) et le k_{off} (la constante de vitesse de dissociation du complexe IF1/MF1) pour chacun des IF1 délétés. Ceci nous donne l'importance de chaque résidu situé en N-terminal d'IF1 dans le pouvoir inhibiteur du peptide. Ainsi on a pu voir que les résidus 1 à 13 n'étaient pas utiles à l'inhibition du peptide et ne jouaient aucun rôle dans la reconnaissance du peptide par l'ATPase. Les résidus 15 ou 16 constituent même une gêne pour l'étape de reconnaissance d'IF1 car les k_{on} des IF1 Δ1-15, IF1 Δ1-16 sont augmentés de 2 à 3 fois par rapport à l'IF1 wT. Ces résidus sont pourtant nécessaires à la stabilisation du complexe inhibé final car le K_i de ces deux mutants augmente de 4 à 20 fois. Plus la délétion se rapproche de la F17, plus la stabilité est affectée. Remplacer le résidu F17 par une sérine augmente le K_i mais n'affecte pas le k_{on}. Ces résidus ne jouent donc aucun rôle dans les premières étapes de reconnaissance du peptide mais plutôt dans la phase de stabilisation du complexe.

Une étude similaire à la nôtre portant sur la partie médiane de bIF1 avait été présentée lors de l'EBEC 2010 [111]EBEC abstract, BBA Vol.1797, Juillet 2010, p28) et a été publiée peu après la nôtre [92]. Dans cette étude des approches de cinétique d'inhibition ont également été utilisées pour mettre en évidence le rôle de certains résidus dans le fragment 1-45 de l'IF1 bovin. Pour cela des mutations ponctuelles ont été faites dans la zone d'inhibition du peptide (région 21-45) et la partie N-terminale d'IF1 a été tronquée progressivement jusqu'au résidu 16. Cette étude a permis de mettre en valeur ou non l'importance de résidus conservés dans le caractère inhibiteur d'IF1 et de montrer que la partie N-terminale du peptide n'était pas nécessaire à l'inhibition de l'ATPase. Nous avons délété jusqu'au résidu précédent directement la phénylalanine 17, alors que l'équipe de John Walker n'a délété que jusqu'au résidu 16, qui correspond au résidu 14 dans notre alignement de séquence et ne correspond à aucun résidu dans l'alignement de John Bason. Les résultats obtenus pour les valeurs de k_{on}, k_{off} et K_i sont différents de ceux que nous avons obtenu. La valeur de k_{on} du wT qu'on obtient est près de 12 fois supérieure à la leur. La valeur de k_{on} augmente de 2 fois dès la délétion des 7 premiers résidus et reste stable dans la progression de la délétion. Seule la délétion de 14 résidus entraine une augmentation de 3,5 fois le k_{on} du wT. Les valeurs de k_{off} sont aussi légèrement plus élevées que celles que nous obtenons dans notre étude et le K_i du wT est au moins 65 fois plus élevé que celui qu'on obtient dans notre étude. Les faibles valeurs de k_{on} obtenues et les fortes valeurs de k_{off} obtenues dans l'étude de John Bason [92] peut s'expliquer essentiellement par les différents pH utlisés. Dans notre étude, nous avons travaillé à pH 6,5 et dans la leur le pH qui a été employé est pH 8,0. Or nous savons que le pouvoir inhibiteur du peptide diminue lorsque le pH augmente [74]. Cependant d'autres différences de protocole peuvent être signalées :

- Tout d'abord la composition du milieu est différents : pH 8 vs pH 6,5, 2mM $MgCl_2$ vs 1mM $MgCl_2$, 2mM MgATP vs 1mM MgATP.
- D'autre part, dans leur étude, Bason *et al*[92] ont utilisé des peptides IF1 sauvage, mutés ponctuellement ou délétés en N-terminal qui ont tous été fusionnés en C-terminal avec une étiquette GFP (Green Fluorescent Protein). La présence de cette grosse protéine de 26 kDa en C-terminal peut aussi modifier et ralentir l'accès du peptide à son site de fixation.

III Modèle de présentation d'IF1 à l'ATPase

Les données obtenues par Vincent Corvest [89][90] au laboratoire ont permis de construire un modèle d'inhibition de l'ATPase de *S.cerevisiae* par IF1 en deux étapes : IF1 vient tout d'abord se fixer sur une des interfaces catalytiques de l'enzyme, probablement celle qui vient juste de fixer l'ATP avant qu'elle ne se referme. Cette fixation est dite "loose" car elle n'est pas définitive, l'hydrolyse d'ATP se poursuit, entraîne la fermeture du site catalytique sur le peptide et verrouille celui-ci

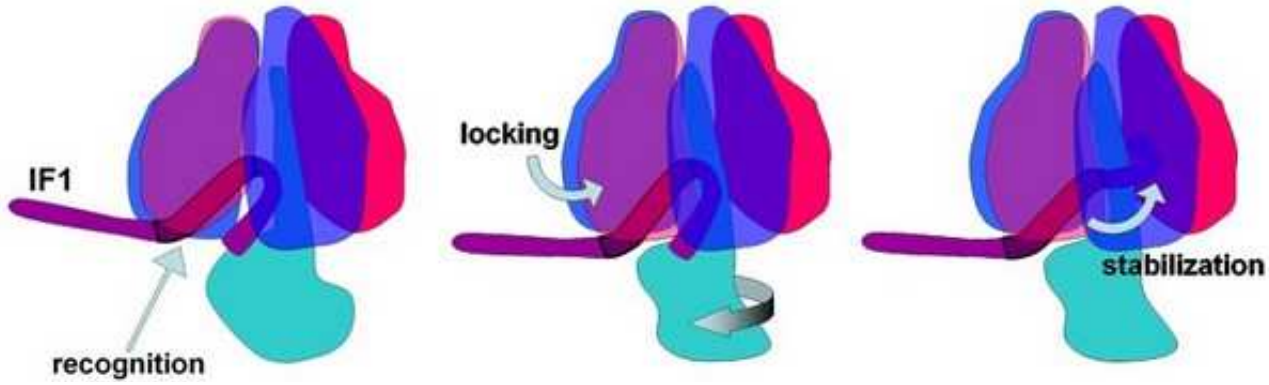


Figure 4.9: **Modèle de présentation du peptide IF1 à l'ATPase**

dans la position telle qu'on la voit dans la structure du complexe inhibé bovin (pdb : 2V7Q)[27]. Les données obtenues avec les peptides tronqués et les peptides allongés complètent cette étude en précisant l'étape de présentation du peptide à l'ATP synthase (fixation, verrouillage, stabilisation). On peut dépeindre 3 phases dans l'inhibition du peptide

- Tout d'abord le peptide se présente à l'enzyme par sa partie médiane 17-45, la partie N-terminale rétractée vers l'arrière de façon à favoriser la phase de reconnaissance de la partie médiane.
- Le peptide est ensuite bloqué dans la poche constituée par les sous-unités α_{DP}-β_{DP}-γ
- La partie N-terminale vient ensuite s'enrouler autour de la sous-unité γ pour stabiliser le complexe inhibé.

L'étude publiée par J. Bason *et al* [92] a conduit à une interprétation intéressante du mécanisme de liaison du peptide bovin sur la F_1-ATPase bovine qui peut compléter celles qui ont été faites par notre laboratoire. Certains acides aminés et particulièrement le résidu F22 (équivalent *S.cerevisiae* : F17) seraient nécessaires au guidage et à la reconnaissance d'IF1 par l'ATPase. Notons cependant que la mutation de ce résidu en sérine ne diminue pas k_{on} dans notre cas. Ces résidus strictement ou très conservés reconnaitraient tout d'abord quelques résidus de la partie C-terminale de la sous-unité β, puis un autre groupe de résidus moins conservés conduit IF1 dans sa poche hydrophobe finale mais n'interagit aucunement avec les sous-unités de la partie F_1. Puis après deux rotations de 120° de la sous-unité γ accompagnées d'un jeu d'interaction entre IF1 et F_1 ; IF1 prend alors sa position finale dans le complexe inhibé IF1-F_1ATPase (pdb : 2V7Q)[27], la sous-unité γ venant s'enrouler ultérieurement autour de γ. Si cette partie N-terminale d'IF1 constitue une gêne pour l'étape de reconnaissance du peptide, on peut se demander quelle est son utilité. Cette partie N-terminale n'est pas très conservée (Figure 4.2), elle pourrait jouer un rôle dans l'adressage du peptide vers les compartiments mitochondriaux ou encore jouer un rôle dans différentes voies de signalisation cellulaire. Une autre hypothèse, plus mécanistique, implique cette partie dans l'éjection du peptide lorsque la force protomotrice est rétablie et que l'ATP synthase se remet à synthétiser l'ATP. Les premiers résidus de la partie N-terminale d'IF1 interagiraient avec la sous-unité γ en agissant comme un ressort, rompraient les interactions établies entre le résidu F22 et les résidus des sous-unités de la partie F_1 environnants et provoqueraient ainsi le relargage du peptide dans la matrice.

D'autres nouvelles données structurales peuvent compléter l'interprétation de notre étude. Le complexe inhibé de levure a été récemment cristallisé par l'équipe de John Walker. Hélas, cette

structure n'est pas publiée et ses coordonnées ne sont pas encore déposées dans la PDB. Cependant, des informations importantes du papier de John Bason ainsi que quelques données recueillies au cours du congrès EBEC, Varsovie, 2010 peuvent être révélées dans cette thèse pour cette discussion. Comparée à la partie N-terminale de l'IF1 de *B.taurus*, celle de *S.cerevisiae* n'est pas structurée. Elle interagit très fortement avec la sous-unité γ. Le résidu D14 d'IF1 semble former un pont salin avec l'arginine 9 de la sous-unité γ. Cette interaction expliquerait pourquoi à partir de ce résidu le k_{off} et le K_i augmente mais n'explique pas l'augmentation du k_{on} par rapport au sauvage.

Cette nouvelle structure non publiée semble révéler un nouvel état intermédiaire dans la catalyse de l'enzyme. Dans cet état, un ATP vient juste d'être hydrolysé, le phosphate et le magnésium viennent juste d'être relargués de l'interface α_E-β_E alors que l'ADP reste encore fixé. On peut se demander si l'état catalytique reconnu chez la levure est différent de celui du bovin auquel cas il serait possible que l'étape de reconnaissance du peptide soit différent selon les organismes. Ces données n'étant pas publiées, il est tout de même préférable de rester prudent quant à une extrapolation hâtive de nos interprétations.

Chapitre 5

Les interactions $\alpha - \gamma$ et $\beta - \gamma$ ont-elles un rôle dans l'inhibition de l'ATP synthase ?

A Introduction

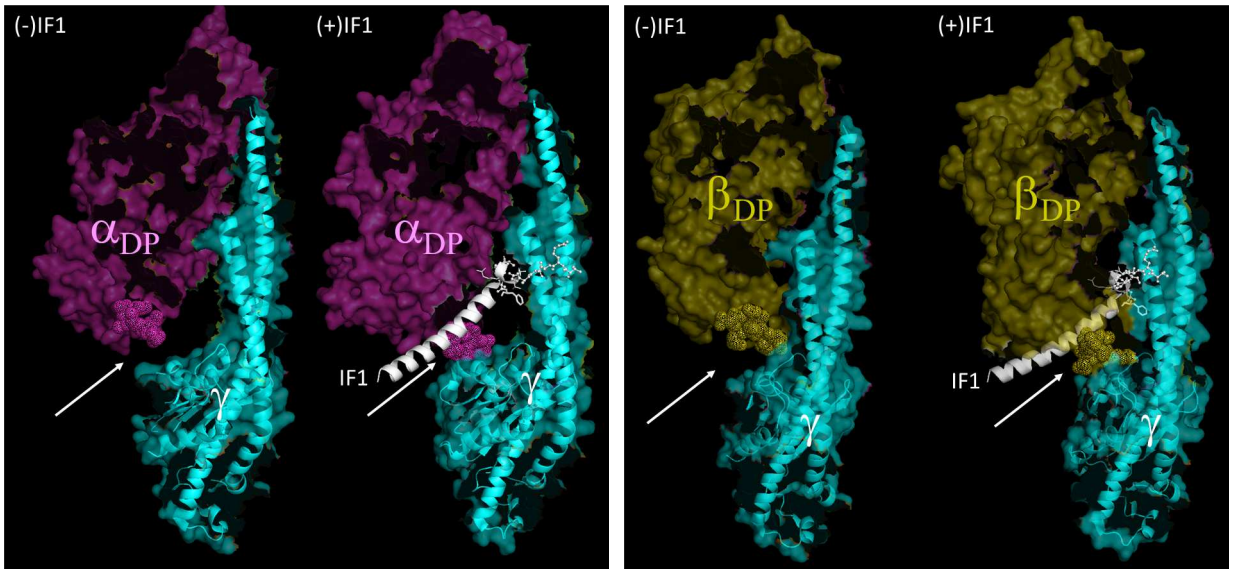
La sous-unité γ joue un rôle majeur dans la catalyse enzymatique de l'ATP synthase. Elle est solidaire de la couronne membranaire des sous-unités c dont la rotation est couplée à la translocation des protons à travers la partie F_0 de l'ATP synthase. Elle déforme séquentiellement les paires catalytiques α et β pour permettre la synthèse ou l'hydrolyse d'ATP. Les contacts entre la sous-unité γ et les parties C-terminales des sous-unités α et β pendant la catalyse enzymatique sont transitoires. Les données cristallographiques révèlent qu'après inhibition de l'hydrolyse d'ATP par le peptide IF1, l'enzyme change de conformation et de nouveaux contacts α-γ et β-γ apparaissent. Dans ce Chapitre, il sera question de voir si ces interactions particulières entre les sous-unités du stator (α-β) avec une partie du rotor (γ) jouent un rôle dans l'inhibition de l'ATPase par IF1.

I Description de la structure bovine

La comparaison des structures tridimensionnelles de la F_1ATPase bovine non inhibée (pdb :1H8E) et inhibée (pdb :2V7Q) montre un changement de conformation de l'enzyme en présence d'IF1 qui se traduit par :

- une fermeture incomplète du site catalytique α_{DP}/β_{DP}
- l'apparition de contacts entre les parties C-terminales des sous-unités de la paire catalytique α_{DP}/β_{DP} avec le pied de la sous-unité γ (Figure 5.1).

En effet, par rapport à l'enzyme non inhibée, les sous-unités catalytiques α_{DP} et β_{DP} entre lesquelles IF1 est intercalé forment une zone de contact étroit avec la sous-unité γ. La partie C-terminale des sous-unités α_{DP} et β_{DP} butent toutes deux contre le haut du pied de la sous-unité γ qui forme une bosse. Les régions de la sous-unité α et de la sous-unité β qui heurtent la sous-unité γ ont été identifiées et correspondent à des séquences très conservées dans le monde des ATP synthases. Les alignements de séquence sont montrés dans le "Matériels et Méthodes". Le motif de la sous-unité α qui bute contre la sous-unité γ correspond à α-^{407}GSDLDAAT^{414} chez *B.taurus* et ^{409}GSDLDAST^{416} chez *S.cerevisiae*, celle de la sous-unité β correspond au motif "DELSEED". La

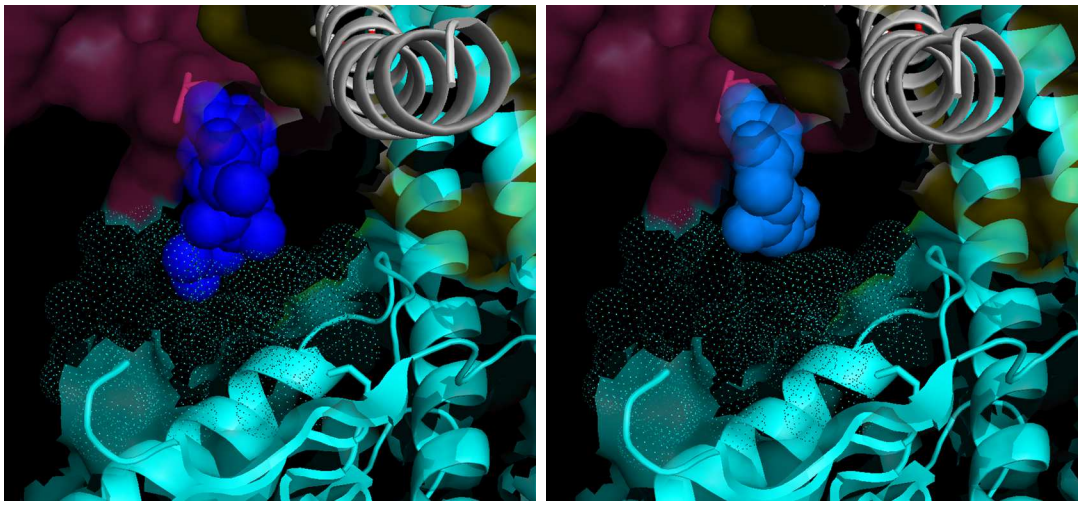


(a) (b)

Figure 5.1: **Comparaison des complexes ATPasiques bovins non inhibé et inhibé par IF1**. (a) Structure 3D montrant la sous-unité α_{DP} et la sous-unité γ dans le complexe non inhibé de l'ATPase (pdb : 1H8E)[29]. A droite, structure 3D montrant la sous-unité α_{DP} et la sous-unité γ dans le complexe inhibé (pdb : 2V7Q). La région en "points" montre la zone de la partie de la sous-unité α_{DP} en contact étroit avec la sous-unité γ dans le complexe inhibé. (b) Structure 3D montrant la sous-unité β_{DP} et la sous-unité γ dans le complexe non inhibé de l'ATPase (pdb : 1H8E). A droite, structure 3D montrant la sous-unité β_{DP} et la sous-unité γ dans le complexe inhibé (pdb : 2V7Q)[27]. La région en "points" montre la zone de la partie de la sous-unité β_{DP} en contact étroit avec la sous-unité γ dans le complexe inhibé.

séquence ^{409}GSDLDAST^{416} n'a jamais été étudiée jusqu' alors comme jouant un rôle particulier dans la catalyse de l'enzyme ni dans l'inhibition de l'ATPase. En revanche le motif DELSEED a déjà très largement été étudié aussi bien dans la catalyse de l'enzyme [112][113] que dans sa régulation [58][114]. Cette boucle de séquence est nommée DELSEED chez *B.taurus* et *E.coli*, DELSDED cher *Bacillus PS3*, DELSEQD chez *S.cerevisiae* et interagit avec la sous-unité γ lors de la catalyse enzymatique, et elle pourrait jouer un rôle dans celle-ci. Mais "DELSEED" semble aussi être impliquée dans la régulation des ATP synthases bactériennes et chloroplastiques. Les chaînes latérales de "DELSEED" forment un cluster de charges négatives qui interagissent avec les charges positives de la sous-unité régulatrice ε. Elles semblent contribuer à l'initiation de l'inhibition de l'ATPase bactérienne par la sous-unité ε [114][115][116].

Le modèle cristallographique présenté dans la Figure 5.1 ne nous permet pas de savoir si ces interactions, qui apparaissent dans le complexe inhibé, sont transitoires ou permanentes. Dans le cas où ces interactions seraient permanentes, il est possible qu'elles jouent un rôle dans le blocage de l'enzyme. Dans ce Chapitre, nous allons donc évaluer le rôle que pourraient avoir ces zones d'interactions α-γ et β-γ dans l'inhibition de l'enzyme en effectuant des cinétiques d'inhibition sur des ATP synthases qui ont été légèrement modifiées dans ces régions.



(a) (b)

Figure 5.2: **Simulation de réduction de l'encombrement stérique sur la sous-unité** α. (a) Zone de contact entre la sous-unité α et la sous-unité γ dans le complexe inhibé bovin (pdb :2V7Q). En représentation "boule" bleu foncé sont représentés les résidus 410 à 416 de la séquence α-^{409}GSDLDAST^{416}. En points couleur cyan sont représentés les résidus de γ qui font face à la boucle α définie par la séquence ^{409}GSDLDAST^{416}. IF1 est en blanc, en représentation cartoon. (b) Zone de contact entre la sous-unité α et la sous-unité γ dans le complexe inhibé bovin (pdb :2V7Q). En représentation "boule", en bleu clair sont représentées les résidus 410 à 416 qui ont été mutés en glycine. En points couleur cyan sont représentés les résidus de γ qui font face à la boucle α mutée. IF1 est en blanc, en représentation cartoon.

II Description de l'étude

Choix des mutants. Pour évaluer le poids de ces interactions dans le processus d'inhibition, la contrainte stérique a été diminuée sur les sous-unités α et β en mutant certains résidus des séquences α-^{409}GSDLDAST^{416} et β-^{394}DELSEQD^{400} en glycine ou en supprimant certains résidus dans la séquence α-^{409}GSDLDAST^{416}. La Figure 5.2 est une simulation de la mutation de la séquence α-^{409}GSDLDAST^{416} en glycine. Elle montre la diminution de la contrainte stérique qui existait entre les sous-unités α et γ. En présence de glycine, la boucle α définie par la séquence ^{409}GSDLDAST^{416} n'est presque plus en contact avec la sous-unité γ.

La Figure 5.3 montre les différents mutants de la sous-unité α et de la sous-unité β qui ont été obtenus. On compte sept mutants "Glycine" et deux mutants de délétion pour la sous-unité α. Aucune suppression d'acides aminés n'a été faite sur la séquence β-^{394}DELSEQD^{400} parce que nous ne voulions pas perturber le fonctionnement de l'enzyme. En revanche, quelques résidus de cette séquence β-^{394}DELSEQD^{400} ont été mutés en glycine pour former quatre mutants (Figure 5.3. La production des mutants est décrite dans le "Matériels et Méthodes".

Description de l'étude cinétique. Pour évaluer l'effet des mutations sur l'inhibition de l'hydrolyse d'ATP par IF1 wT, une étude cinétique identique à celle décrite dans les Chapitres 2, 3 et 4 a été entreprise. Tout comme précédemment, les paramètres cinétiques k_{on} et $K_i.k_{on}$ (k_{off}) ont

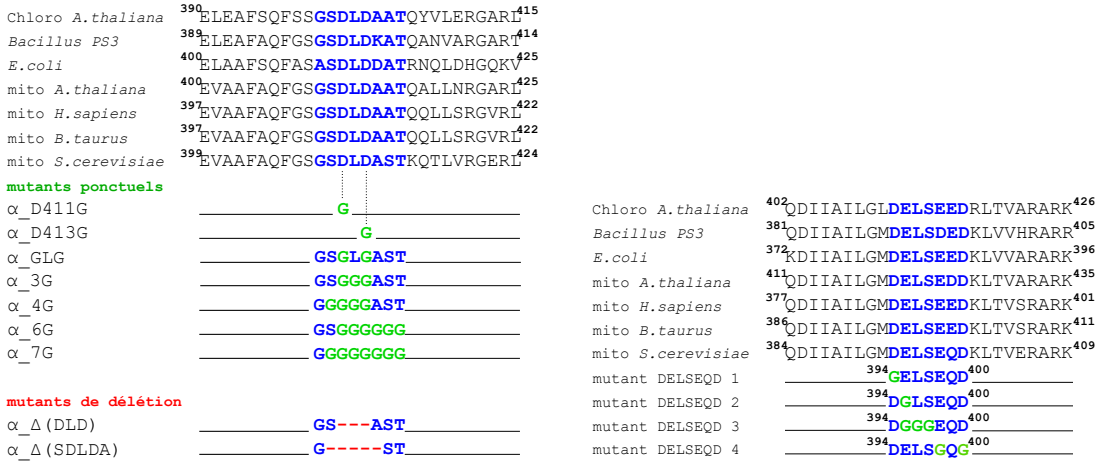


Figure 5.3: **Alignement de séquences des sous-unités α et β et présentation des mutants**. (a) Alignement et mutants sur la sous-unité α. (b) Alignement et mutants sur la sous-unité β

été déterminés. Ces données renseignent non seulement sur l'accessibilité du peptide à l'enzyme, soit la reconnaissance du peptide par l'enzyme (k_{on}) mais aussi sur la stabilité du complexe (k_{off}, K_i). A concentration saturante d'IF1 wT, l'activité ATPasique wT doit totalement être inhibée par le peptide wT. L'activité ATPasique finale doit alors être presque nulle. Cependant, dans le cas où la F_1-ATPase est modifiée il est possible que l'effet inhibiteur du peptide ne soit pas complet. L'activité hydrolytique restante pourrait alors être due à l'activité ATPasique propre du complexe ATPasique modifié ou à une activité ATPasique résiduelle contaminante contenue dans la préparation de SMP. Mais étant donné sa faible valeur, elle pourrait être causée par d'autres facteurs comme l'auto-oxydation du NADH, par exemple. Dans ce cas, il ne s'agirait donc pas d'activité résiduelle ATPasique mais d'un artefact. Et cet artefact sera d'autant plus visible que l'activité ATPasique sera faible. Il dépendra donc de l'activité spécifique et donc de la concentration en SMP. Cette dernière remarque sera essentielle pour l'interprétation correcte des résultats obtenus sur les différents mutants et sera discutée page 123.

Préparation des SMP. Dans cette étude, nous avons du travailler sur deux types de SMP. Des SMP dites "non centrifugées", utilisées dans les précédents Chapitres, et des SMP dites "centrifugées" qui ont du subir deux cycles de centrifugation. En effet pour certains mutants, nous avons d'une part observé une certaine instabilité dans la vitesse d'hydrolyse qui se traduisait par le fait que celle-ci n'atteigne jamais ou difficilement l'état stationnaire. Ceci pourrait être du aux mutations ou à des contaminants présents dans la préparation de SMP. D'autre part, comme il l'a été expliqué dans le paragraphe "Description de l'étude cinétique" II, nous avons observé dans quelques cas une "activité hydrolytique résiduelle" après inhibition. Pour éliminer tous doutes sur l'origine de cette activité résiduelle, nous avons décidé de travailler sur des SMP "centrifugées". Les SMP ont subi deux cycles de centrifugation. Une première centrifugation à basse vitesse pour éliminer les débris membranaires suivie d'une centrifugation à haute vitesse pour éliminer les éventuels contaminants solubles[88].

Les cinétiques d'inhibition ont tout d'abord été effectuées sur les SMP "non centrifugées", puis sur les SMP centrifugées. Après comparaison des valeurs des différents paramètres cinétiques sur SMP non centrifugées et sur SMP centrifugées, il nous est apparu que ni le paramètre k_{on}, ni le K_i n'aient été affectés. En revanche, les données concernant les activités résiduelles peuvent être modifiées significativement selon que les SMP soient centrifugées ou non. Nous discuterons ce point également. Pour éviter toutes questions inutiles, la plupart des SMP a été centrifugée. Nous ne montrerons donc uniquement les résultats réalisés à pH 6,5 sur SMP centrifugées, sauf en l'absence de données auquel cas, nous ferons appel aux données obtenues sur SMP non centrifugées (données entre crochets dans les Tableaux).

B Résultats

I Effets des modifications de la sous-unité α sur l'inhibition de l'hydrolyse d'ATP par IF1 wT sur SMP

Modification du paramètre cinétique k_{on}

Dans le complexe inhibé, les résidus de la sous-unité α qui sont les plus proches de la "bosse" de la sous-unité γ sont les résidus ^{411}DLD^{413}. La mutation de l'un de ces acides aminés ou de ces trois acides aminés peut modifier l'inhibition de l'ATPase si le contact entre la sous-unité α et γ joue un rôle dans le mécanisme d'inhibition de l'ATPase. La Figure 5.4 montre quelques exemples de constantes d'inhibition apparentes (k_{app}) en fonction de la concentration en IF1. Les valeurs de k_{on} qui ont été mesurées pour chacun des mutants de α-^{409}GSDLDAST^{416} sont rassemblées dans le Tableau 5.1, page 114. Nous pouvons voir que la mutation d'un résidu de la séquence α-^{411}DLD^{413} diminue déjà le k_{on} de 1,4 à 1,9 fois par rapport au wT. Cependant la mutation du résidu D411 semble avoir un peu plus d'effet sur la reconnaissance du peptide par l'enzyme ($k_{onD411G}$: 1,8 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$ et $k_{onD413G}$: 2,4 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$). L'ajout successif de glycine dans la séquence α-^{409}GSDLDAST^{416} ne modifie pas plus le k_{on} que la mutation d'un seul résidu D411G. On peut voir que l'ensemble des valeurs de k_{on} tournent autour d'une valeur médiane de 1,85 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$ et pour l'ensemble des mutants, elles sont diminuées d'un facteur 1,8 à 2,1, sauf dans le cas du mutant α-7G où le k_{on} est diminué de 1,3 fois. Mais cette faible diminution peut-être due au fait qu'une seule expérience a été faite sur ce mutant. En d'autres termes la mutation d'un seul résidu D411G suffit à diminuer la reconnaissance du peptide par l'enzyme. L'ajout de mutations supplémentaires ne diminue pas ce paramètre. Cependant il est intéressant de voir que la modification de cette région, voire d'un seul résidu (D411), située assez loin du site de fixation d'IF1, provoque une diminution notable de la reconnaissance d'IF1 par l'ATP synthase. Nous discuterons de ce point dans la discussion.

La délétion des résidus ^{411}DLD^{413} ou des résidus ^{410}SDLD^{413} a un effet similaire à la mutation du résidu D411, c'est-à-dire que leurs k_{on} est diminué de 1,9 à 2 fois par rapport à la valeur du wT. En résumé, la modification de la séquence ^{409}GSDLDAST^{416}, qu'elle soit par substitution par des glycines ou par délétion de la séquence ^{410}SDLD^{413} provoque une baisse du k_{on} de 1,3 à 2,4 fois par rapport au wT.

Modification de la stabilité du complexe inhibé : effets sur K_i et $K_i.k_{on}$

Les mutants "Glycine". La Figure 5.5 montre le rapport des vitesses V_I et V_0 en fonction de la concentration en IF1 (15 nM à 2 μM). L'encadré en pointillé est un agrandissement de la

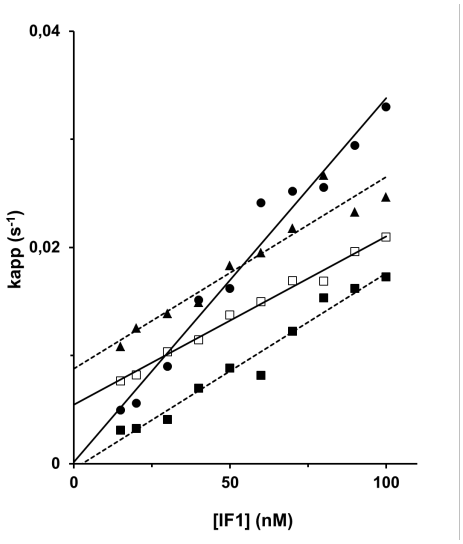


Figure 5.4: **Constante cinétique d'inhibition apparente en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25°C pour les mutants α-^{409}GSDLDAST^{416}.** (–●–) : wT ; (· · · ■ · · ·) : D411G ; (–□–) : 6G ; (· · · ▲ · · ·) Δ-DLD.

	Mutants	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)
Mutants "Glycine"	**wT**	3,4 x 10^5
	D411G	1,8 x 10^5
	D413G	2,4 x 10^5
	GLG	1,9 x 10^5
	3G	1,4 x 10^5
	4G	[1,8 x 10^5]
	6G	1,6 x 10^5
	7G	2,6 x 10^5
Mutants de délétion	**ΔDLD**	1,8 x 10^5
	ΔSDLDA	[1,7 x 10^5]

Tableau 5.1: **Valeurs de k_{on} sur les mutants de α-^{409}GSDLDAST^{416}.** Les valeurs de k_{on} présentées ici sont exprimées en $M^{-1}.s^{-1}$. Les valeurs entre crochets correspondent aux valeurs de k_{on} obtenues avec les SMP non centrifugées.

Figure 5.5 pour des concentrations en IF1 comprises entre 15 nM et 100 nM. 3 mutants de α-^{409}GSDLDAST^{416} (D411G, 7G, ΔDLD) figurent sur ce graphique à titre d'exemple. Les valeurs de K_i et $K_i.k_{on}$ obtenues pour l'ensemble des mutants ont été rassemblées dans le Tableau 5.2. Tout comme il l'a été observé pour les variations de k_{on} la substitution d'un acide aminé dans la séquence ^{411}DLD^{413} suffit à augmenter le K_i. En effet celui-ci augmente d'un facteur 2 lorsque le résidu 411 est substitué en glycine. En revanche la mutation D413G semble avoir un effet moindre sur le K_i puisque celui-ci reste inférieur au nM. Cette première observation semble être cohérente avec les résultats qui avaient été obtenus dans les mesures de k_{on}, où le $k_{onD413G}$ était plus proche de la valeur du wT. La modification de ces paramètres cinétiques souligne ici l'importance du résidu D411 par rapport au résidu D413 dans le mécanisme d'inhibition de l'ATPase. La substitution progressive de la séquence ^{409}GSDLDAST^{416} semble entraîner une augmentation significative du K_i. La substitution de deux résidus par des glycines (GLG) augmente le K_i d'au moins un facteur 9. Le K_i est doublé par rapport au $K_{i\alpha-GLG}$ lorsque 3 glycines sont ajoutées (α-3G) et celui du mutant α-6G est au moins 20 fois plus élevé que celui du wT. La diminution de l'encombrement stérique par substitution de la séquence ^{409}GSDLDAST^{416} en glycines déstabiliserait donc le complexe inhibé comme nous en avions émis l'hypothèse dans l'introduction de ce Chapitre. Cependant les mutants α-4G et α-7G ne suivent pas cette augmentation croissante de K_i. Leur valeur aurait du être comprise entre celle du mutant α-3G et du mutant α-6G pour le mutant α-4G, et supérieure à celle de l'α-6G pour le mutant α-7G. Nous observons que ces valeurs sont inférieures à celles des mutants qui les précèdent (K_{i3G} : 14,1 nM et K_{i4G} : 6,4 nM ; K_{i6G} : 21,7 nM et K_{i7G} : 13,2 nM). Dans la séquence de ces deux mutants (Figure 5.3), on s'aperçoit que la sérine S410 a été mutée en glycine dans les deux cas. L'absence de cette sérine semblerait diminuer le K_i et restabiliser le complexe inhibé. Les valeurs de k_{off} ($K_i.k_{on}$) semblent augmenter avec le nombre de glycines insérées dans la séquence ^{409}GSDLDAST^{416}. La valeur de k_{off} augmente légèrement lorsque le résidu D411 est muté en glycine, puis il augmente d'un facteur 9 par rapport au wT dans le cas de l'α-GLG. L'évolution du k_{off} est comparable à celui du K_i puisque les variations de k_{on}. Ces données montrent bien que plus on diminue l'encombrement stérique en substituant les résidus de la séquence ^{409}GSDLDAST^{416} en glycine, plus l'IF1 tend à se dissocier du complexe ATPasique.

Les mutants de délétion. La délétion des acides aminés DLD dans la séquence ^{409}GSDLDAST^{416} conduit à K_i (29,8 nM) proche de celle observée pour le mutant α-6G (K_i : 21,7 nM). La délétion de cette séquence pourrait provoquer une diminution stérique au niveau du contact entre α et γ qui entraînerait une diminution d'affinité de l'IF1 pour l'ATPase et la déstabilisation du complexe. En revanche le K_i du mutant α-ΔSDLDA est de 2,4 nM, soit près de 10 fois inférieur à celui du mutant ΔDLD. Il est surprenant de voir que la suppression d'un résidu supplémentaire diminue considérablement la valeur de K_i et il est à priori difficile d'expliquer une telle observation. Cependant, ce résultat reste cohérent avec celui qui avait été observé pour l'α-4G et l'α-7G. L'absence de la sérine 410 entraîne ici aussi une baisse de K_i. Nous confirmons donc que la substitution ou la suppression de ce résidu entraîne la stabilisation du complexe, cet effet étant toutefois plus prononcé dans le deuxième cas.

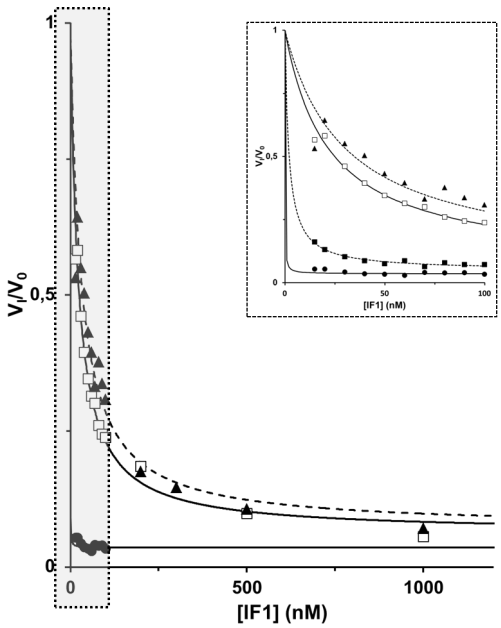


Figure 5.5: **Rapport des vitesses $\mathbf{V}_I$ et $\mathbf{V}_0$ en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25°C sur SMP centrifugées**. (–●–) : wT ; (· · · ■ · · ·) : D411G ; (–□–) : 6G ; (· · · ▲ · · ·) Δ-DLD. La figure contenue dans l'encadré en haut à droite est un agrandissement de la zone grisée sur la figure principale. Dans l'encadré on peut voir que l'inhibition maximale est atteinte après injection de 15 nM d'IF1 wT pour les SMP wT et après injection de 60 nM pour les SMP αD411G.

		$\mathbf{K}_i$ (nM)	$\mathbf{K}_i.\mathbf{k}_{off}$ ($\mathbf{s}^{-1}$)
Mutants "Glycine"	**wT**	< 1 nM	< 3,4 x 10^{-4}
	D411G	1,9	3,5 x 10^{-4}
	D413G	< 1 nM	< 2,4 x 10^{-4}
	GLG	9,3	1,7 x 10^{-3}
	3G	14,1	2 x 10^{-3}
	4G	[6,4]	[1,1 x 10^{-3}]
	6G	21,7	3,5 x 10^{-3}
	7G	11,9	1,3 x 10^{-3}
Mutants de délétion	**ΔDLD**	29,8	5,3 x 10^{-3}
	ΔSDLDA	[2,4]	[4,1 x 10^{-4}]

Tableau 5.2: **Valeurs de $\mathbf{K}_i$, $\mathbf{k}_{off}$ et activité ATPasique résiduelle pour les mutants de α-^{409}GSDLDAST^{416} à pH 6,5, 25°C**. Entre crochets, les valeurs obtenues sur SMP non centrifugées.

Mutants	wT	GELSEQD	DGLSEQD	DGGGEQD	DELSGQG
k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	3,4 x 10^5	3 x 10^5	[3,2 x 10^5]	2,1 x 10^5	3 x 10^5

Tableau 5.3: **Valeurs de k_{on} pour les mutants de β-DELSEQD à pH 6,5, 25°C**. Les k_{on} présentées ici sont exprimées en $M^{-1}.s^{-1}$. Entre crochets sont notées les valeurs qui ont été obtenues sur SMP non centrifugées.

II Effets des modifications de la sous-unité β sur l'inhibition de l'hydrolyse d'ATP par IF1 wT sur SMP

Effets sur la reconnaissance d'IF1 par l'ATP synthase

La Figure 5.6 montre la constante cinétique d'inhibition apparente en fonction de la concentration en IF1. Par rapport aux modifications effectuées sur la sous-unité α, les mutations de substitution sur la séquence β-DELSEQD semblent avoir eu peu d'effet sur le k_{on}. En effet, les k_{on} des mutants GELSQED, DGLSEQD et DELSGQG sont quasiment identiques à celui du wT (3,4 x 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$), ce qui montre que la substitution de ces résidus n'influe pas sur la reconnaissance du peptide par l'enzyme. En revanche, la substitution de trois résidus en glycine (DGGGEQD) semble diminuer légèrement la valeur de k_{on}, soit d'un facteur 1,7 fois. La mutation des résidus D394, E395, E398 et D400 ne semblent avoir eu aucun effet sur le paramètre k_{on}, suggérant que ces résidus ne jouent aucun rôle dans la reconnaissance d'IF1 par l'ATPase. Par contre, la mutation β-DGGGEQD semble avoir eu le même effet sur le k_{on} que les mutations dans la boucle α. La diminution de l'encombrement au niveau du contact β-DELSEQD-γ pourrait modifier les propriétés catalytique de l'enzyme et modifier l'action du peptide IF1 sur l'ATP synthase (Voir Section C, page 122).

Effets des modifications de β sur la stabilité du complexe inhibé

La Figure 5.7 montre le rapport des vitesses d'hydrolyses $\frac{V_I}{V_0}$ en fonction de la concentration en IF1. Le Tableau 5.4 montre que les valeurs de K_i des mutants de β-DELSEQD sont relativement faibles. Le K_i du mutant DGGGEQD est inférieur au nM et le K_i des autres mutants ne dépassent pas les 3 nM. Cette valeur est très imprécise mais significativement plus élevée que celle du wT. Les mutations de substitution dans la boucle β-DELSEQD ne semblent pas altérer l'affinité du peptide pour l'enzyme ou sans doute très faiblement. La boucle DELSEQD ne jouerait qu'un rôle extrêmement limité voire inexistant dans le mécanisme d'inhibition de l'ATPase.

III Effet des modifications sur l'activité enzymatique de l'ATPase

En utilisant les mutants de la séquence α-^{409}GSDLDAST^{416}, nous avons observé une diminution du k_{on} qu'il est difficile d'expliquer puisque la séquence α-^{409}GSDLDAST^{416} est loin du site de fixation du peptide. Au laboratoire, il a été montré par Corvest *et al* que le k_{on} était lié à l'activité de l'enzyme [89][90]. Les variations de k_{on} qu'on observe pourraient donc être dues à des modifications des propriétés catalytique de l'enzyme. Nous avons donc commencé à faire une étude de l'activité enzymatique de l'ATPase en déterminant le K_M de certains mutants de α-^{409}GSDLDAST^{416} et de β-

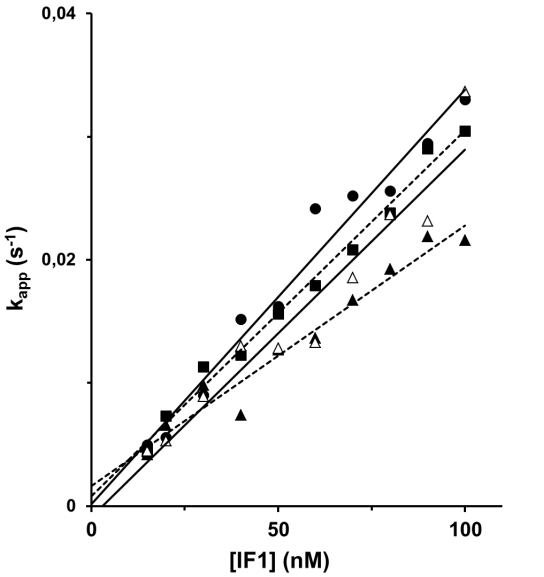


Figure 5.6: **Vitesses d'inhibition apparentes en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25˚C pour les mutants DELSEQD**. (–●–) wT, (· · · ■ · · ·) GELSEQD, (–□–) DGLSEQD, (· · · ▲ · · ·) DGGGEQD, (–△–) DELSGQG.

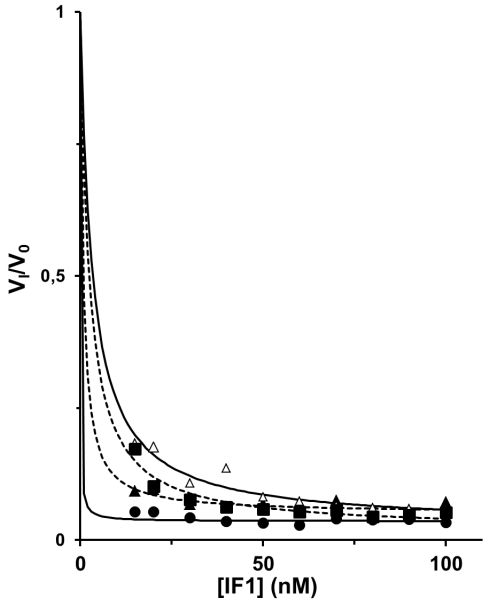


Figure 5.7: **Rapport des vitesses $\mathbf{V}_I$ et $\mathbf{V}_0$ en fonction de la concentration en IF1 à pH 6,5, 25˚C**. (–●–) wT, (· · · ■ · · ·) GELSEQD, (–□–) DGLSEQD, (· · · ▲ · · ·) DGGGEQD, (–△–) DELSGQG.

Mutants	**K_i (nM)**	**$K_i.k_{on}$ (s^{-1})**
wT	< 1	$< 3{,}4 \times 10^{-4}$
GELSEQD	2,3	$6{,}9 \times 10^{-4}$
DGLSEQD	[3]	$[9{,}5 \times 10^{-4}]$
DGGGEQD	< 1	$< 2{,}1 \times 10^{-4}$
DELSGQG	3,2	$9{,}6 \times 10^{-4}$

Tableau 5.4: **Valeurs de K_i, $K_i.k_{on}$ pour les mutants de β-DELSEQD à pH 6,5, 25°C**.)

	wT	**GLG**	**3G**	**4G**	**ΔDLD**
K_M (μM)	42	122	103	142	72

Tableau 5.5: Valeur de K_M calculée pour chaque mutant d'α.

^{394}DELSEQD^{400}. Pour l'instant, la constante catalytique de l'enzyme k_{cat} n'a pas pu être définie car nous n'avons pas déterminer les concentrations d'ATP synthases présentes dans les préparations de SMP. Les vitesses stationnaires d'hydrolyse sont mesurées en utilisant une gamme de concentration en MgATP allant de 500 nM à 4 mM. Les vitesses d'hydrolyse d'ATP ont ensuite été normalisées par rapport à la vitesse maximale calculée (voir Matériels et Méthodes)

Effets des mutations de la sous-unité α sur l'activité enzymatique. La Figure 5.8 montre la vitesse d'hydrolyse normalisée à 1 en fonction de la concentration en MgATP. Les mutants qui ont été utilisés pour cette étude sont les suivants :

- α-GLG
- α-3G
- α-4G
- α-ΔDLD

La Figure 5.8 permet de déterminer à demi-vitesse maximale la constante de Michaelis de l'enzyme pour son substrat MgATP, K_M. Le Tableau 5.5 montre les K_M obtenus pour chacun des mutants. Les K_M des mutants sont 1,7 à 3,3 fois plus élevés que le K_M du wT. En ce qui concerne les mutants dont quelques résidus ont été substitués en glycine, il semblerait que plus on ajoute de glycine plus le K_M augmente ($K_M(wT)$: 42 μM < $K_M(3G)$: 103 μM < $K_M(GLG)$: 122 μM < $K_M(4G)$:142 μM).

Effets des mutations de la sous-unité β sur l'activité enzymatique Nous avons effectué la même étude sur 2 des mutants "DELSEQD" : β-D<u>G</u>LSEQD et β-D<u>GGG</u>EQD La Figure 5.9 montre la courbe de Michaelis-Menten effectuée pour le wT et les deux mutants de DELSEQD. Tout comme les courbes précédentes, on peut déduire les K_M des mutants et du wT. Les valeurs de K_M est identique (76μM) pour les deux mutants β-D<u>G</u>LSEQD et β-D<u>GGG</u>EQD. Elle est 1,8 fois supérieure à celle du wT.

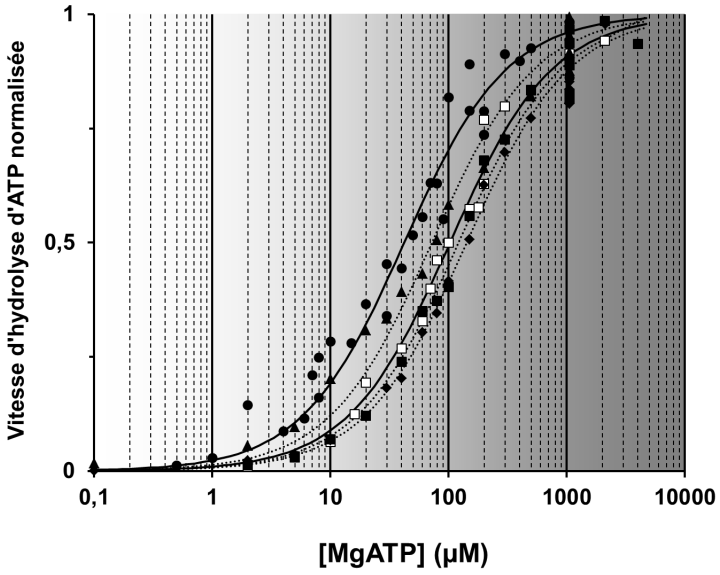


Figure 5.8: **Vitesse d'hydrolyse d'ATP normalisée en fonction de la concentration en MgATP pour les mutants de la sous-unité** α. Après préparation des SMP (Matériels et Méthodes), 10 à 15μL de SMP sont injectés dans une cuve de mesure thermostatée à 25˚C contenant le tampon de mesure à pH 6,5. L'hydrolyse d'ATP est mesurée grâce à la disparition du NADH qui est suivie à $\lambda = 340$ nm. (–●–) : wT ; (· · · ■ · · ·) : α-GLG ;(–□–) : 3G ; (· · · ♦ · · ·) : 4G ; (· · · ▲ · · ·) : ΔDLD.

		SMP NC	SMP C
	wT	7,6 %	2,2 %
Mutants de α	**D411G**	9,3 %	3,1 %
	D413G	-	5 %
	GLG	9,3 %	10,5 %
	3G	14,1 %	11, 3 %
	4G	14,2 %	-
	6G	-	6,3 %
	7G	15,4 %	n.d
Mutants de β	**GELSEQD**	-	4,1 %
	DGLSEQD	10,9 %	-
	DGGGEQD	15,3 %	5,1 %
	DELSGQG	8,2 %	2,7 %

Tableau 5.6: **Valeurs des activités résiduelles (%) observées après inhibition sur SMP non centrifugées et centrifugées**

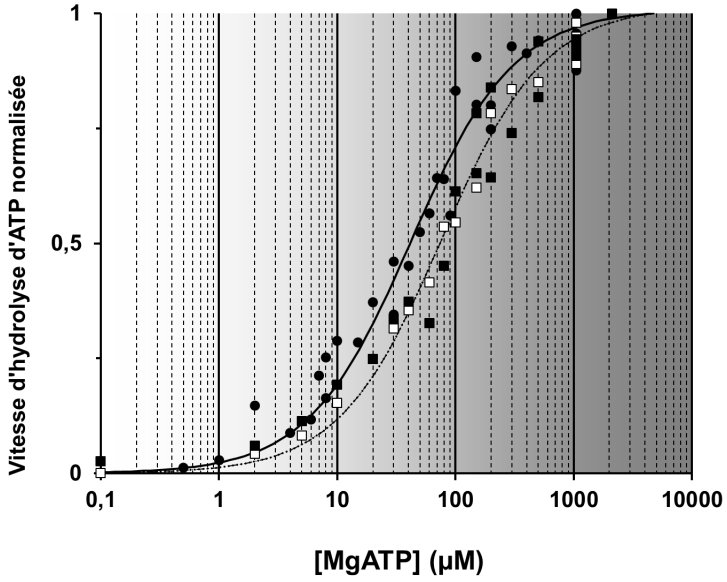


Figure 5.9: **Vitesse d'hydrolyse d'ATP en fonction de la concentration en MgATP pour les mutants de** β. Condition identique à celle de la Figure 5.8. (–●–) : wT ;(· · · ■ · · ·) : β-DGLSEQD ; (–□–) : β-DGGGEQD

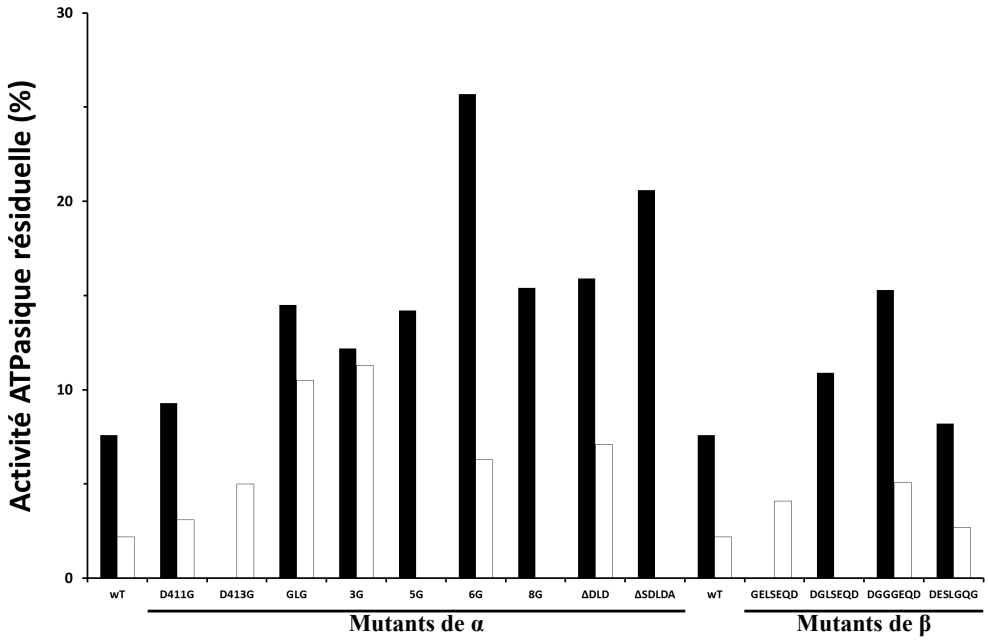


Figure 5.10: **Activité ATPasique résiduelle observée après inhibition de l'ATPase par IF1 sur les mutants de** α **et de** β.

C Discussion et Perspectives

L'étape de reconnaissance du peptide par l'enzyme est légèrement affectée par les modifications de la boucle α. Les résultats montrent que la modification de la boucle α au niveau du contact α-γ diminue quelque peu la valeur du k_{on} par rapport au wT. Cependant la mutation d'un seul résidu (D411G) suffit à provoquer un effet quasi maximal sur ce k_{on}. Les valeurs de k_{on} sont réduites d'un facteur 1,3 à 2,1 pour l'ensemble des mutants. De même pour le mutant β-DGGGEQD qui présente un k_{on} affecté d'un facteur 1,7. Ces diminutions du k_{on} signifieraient que l'étape de reconnaissance du peptide par l'enzyme est affectée par les modifications effectuées sur la sous-unité α et par la substitution des acides aminés dans la séquence DELSEQD. Si tel est le cas, on peut être plus précis en mentionnant que le résidu D411 et les résidus 395 à 397 de la séquence ^{394}DELSEQD^{400} pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance d'IF1 par l'enzyme. Dans le Chapitre 2, il a été question de rechercher les résidus spécifiquement mitochondriaux responsables de la reconnaissance du peptide par l'enzyme. Les résidus qui avaient été choisis sur la sous-unité α ne semblaient pas participer à cette première étape de reconnaissance. La suggestion a donc été de rechercher des résidus situés dans la périphérie de la partie F_1 qui soient impliqués et décisifs dans l'étape de reconnaissance. La boucle α et plus particulièrement le résidu D411 étant situé en C-terminal de la sous-unité α, soit en périphérie de α, pourrait jouer ce rôle, en interagissant avec un des résidus du peptide IF1. De même, la séquence DELSEQD est en périphérie de la sous-unité β et pourrait être accessible à l'IF1 lors de sa présentation à l'enzyme. Ces résidus ne sont certes pas spécifiques au monde mitochondrial mais sont très conservés dans le monde des ATP synthases. Les mutations qui ont été faites sur la boucle α et le mutant β-DGGGEQD ont probablement diminué les surfaces de contact α - γ et β - γ. La sous-unité γ intervient dans le cycle catalytique en déformant séquentiellement les paires catalytiques, permettant ainsi la catalyse de l'enzyme. Il est possible qu'en mutant ces régions, proches de γ, nous ayons modifier les zones de contacts, nécessaires à la catalyse enzymatique. Pour vérifier cette hypothèse nous avons entrepris une étude enzymatique dans laquelle nous n'avons pu déterminer le K_M pour l'instant. Les résultats nous montrent que plus on substitue de résidus dans la boucle α en glycine , plus on augmente le K_M ($K_M(wT) : 42\ \mu M < K_M(3G) : 103\ \mu M < K_M(GLG) : 122\ \mu M < K_M(4G) : 142\ \mu M$). Il n'existe pas de lien direct et simple qui permettent de lier les variations de k_{on} avec les paramètres cinétiques.

La stabilité du complexe est affectée par les modifications effectuées sur la sous-unité α. Les K_i observés pour les mutants DELSEQD ne dépassent pas 3 nM. Ceci suggère que les modifications effectuées sur la la séquence DELSEQD n'affecte pas beaucoup la stabilité du complexe IF1-F_1-ATPase. La séquence DELSEQD n'a donc pas un rôle essentiel dans la stabilisation du complexe IF1-F_1-ATPase. En revanche, les mutations effectuées sur la sous-unité α ont des effets plus notables sur le K_i. Les substitutions progressives des résidus de la séquence ^{409}GSDLDAST^{416} entrainent des augmentations progressives du K_i. En effet, on obtient les inégalités suivantes : $K_{iwT} < K_{iGLG} < K_{i3G} < K_{i6G}$. En revanche l'augmentation progressive du K_i n'est pas observée pour les mutants 4G, 7G et Δ-SDLDA. Les K_i de ces mutants sont diminués par rapport au mutant 3G, 6G et Δ-DLD. Le point commun entre les mutants 4G, 7G et Δ-SDLDA est la mutation ou la délétion de la sérine 410. Les résultats montrent que lorsque cette sérine est mutée ou tronquée, le K_i est diminué. L'IF1 est donc plus affin pour l'ATP synthase et le complexe IF1-F_1-ATPase semble donc plus stable. Hélas, la sérine 410 n'étant pas résolue dans la structure du complexe inhibé bovin [98], il est impossible de prédire quels sont les résidus de γ avec lesquelles elle interagit. Les résidus 411 à 416 ne sont pas en contact avec le peptide dans le complexe inhibé. Il est donc raisonnable de

penser que ce sont les interactions de ces résidus avec γ et non avec IF1 qui stabilisent le complexe. La structure 3D du complexe inhibé montre que les C=O des résidus D411 et A412 dans la nomenclature bovine correspondant aux résidus D413 et A414 chez la levure forment des liaisons hydrogènes avec les résidus R118, H117 et R116 de la sous-unité γ. La stabilisation du complexe inhibé peut alors se faire par contrainte stérique et par des interactions faibles entre les résidus de la sous-unité α et de la sous-unité γ.

Signification de l'activité ATPasique résiduelle. Dans les expériences cinétiques effectuées sur les mutants d'α et de β, il a souvent été observé la présence d'une activité ATPasique persistant après inhibition de l'ATPase par IF1 à concentration saturante. Dans cette étude nous avons vu que les valeurs des paramètres cinétiques et de K_i de chaque mutant ne variait pas significativement selon que les SMP soient centrifugées ou non (résultats non montrées pour les SMP non centrifugées). En revanche, nous avons observé des différences notables sur les activités résiduelles des SMP centrifugées qui semblaient être moins élevées que celles des SMP non centrifugées, suggérant que les activités résiduelles subsistantes dans les SMP non centrifugées sont dues à des activités ATPasiques contaminantes. La Figure 5.10 et le Tableau 5.6 montre les activités résiduelles obtenues après inhibition de l'ATP synthase par IF1 pour les SMP mutées centrifugées et non centrifugées. Pour le wT l'activité résiduelle est diminuée de 3 fois dans les SMP centrifugées (SMP non centrifugées : 7,6 %, SMP centrifugées : 2,2 %). D'une manière générale l'activité résiduelle des SMP "centrifugées" est inférieure ou égale à celle des SMP "centrifugées et ne dépasse jamais 10%. Après avoir inhibé l'hydrolyse d'ATP à concentration saturante d'IF1 (1 à 2μM), il reste une activité résiduelle. Si elle est propre à l'ATPase entière, l'ajout d'oligomycine (10μg/mL) devrait inhiber l'activité résiduelle. Différents essais ont été effectués mais l'oligomycine ne semble pas inhiber totalement l'activité résiduelle ATPasique. Les observations étant indirectes et représentant un signal (absorbance 340 nm), il pourrait s'agir d'un artefact.

L'interaction α-γ dans le mécanisme d'inhibition Dans le Chapitre précédent nous avions démontré le rôle et la place de la partie N-terminale d'IF1 dans la stabilisation du complexe inhibé. Ici, nous nous sommes intéressés à un autre aspect du mécanisme d'inhibition qui n'impliquait pas directement le peptide inhibiteur mais un jeu d'interaction entre les sous-unités catalytiques et la sous-unité γ. En effet, la structure tridimensionnelle du complexe inhibé nous a montré que la présence d'IF1 au sein de l'ATPase entrainait des changements de conformation qui se traduisaient par la fermeture incomplète de la paire catalytique α_{DP}/β_{DP} mais aussi l'apparition de contacts étroits entre la partie C-terminale des sous-unités α et β avec la bosse de la sous-unité γ. Nous avons vu dans ce Chapitre, que les résidus situés dans les zones d'interaction α-γ, pourtant loin du site de fixation, entraînait une baisse significative de l'affinité du peptide pour l'enzyme. Les résultats que nous avons obtenus confirment nos hypothèses de départ, basées sur la structure tridimensionnelle du complexe inhibé. En réunissant toutes les données que nous avons obtenus dans ces deux derniers chapitres de thèse, il nous est possible de préciser un peu plus les différentes étapes de stabilisation du peptide au sein de l'enzyme. Après que le peptide s'est présenté à l'enzyme par sa partie médiane, la partie N-terminale vers l'arrière, quelques résidus conduisent le peptide vers son site de fixation. Puis l'interface α/β se referment sur la partie médiane d'IF1. Cette fermeture est incomplète, ce qui peut être dû à l'insertion du peptide lui-même au sein du complexe mais aussi dû à l'interaction des résidus de la boucle α avec la sous-unité γ. Trois zones de contacts sont visibles dans le complexe inhibé et semblent nécessaires à maintenir le peptide bloqué et stabilisé dans le complexe inhibé :

– La fermeture du site, et plus particulièrement la sous-unité β, sur le peptide
– L'enroulement de la partie N-terminale d'IF1 autour de γ que nous avons étudié dans le Chapitre précédent
– La zone de contact α-γ dont nous venons de confirmer le rôle stabilisateur dans ce Chapitre.

Quelque soit l'ordre dans lequel apparaissent ces trois évènements, il est tentant de représenter ces trois points comme les trois clés nécessaires à l'emprisonnement du peptide dans la cage "F_1-ATPase".

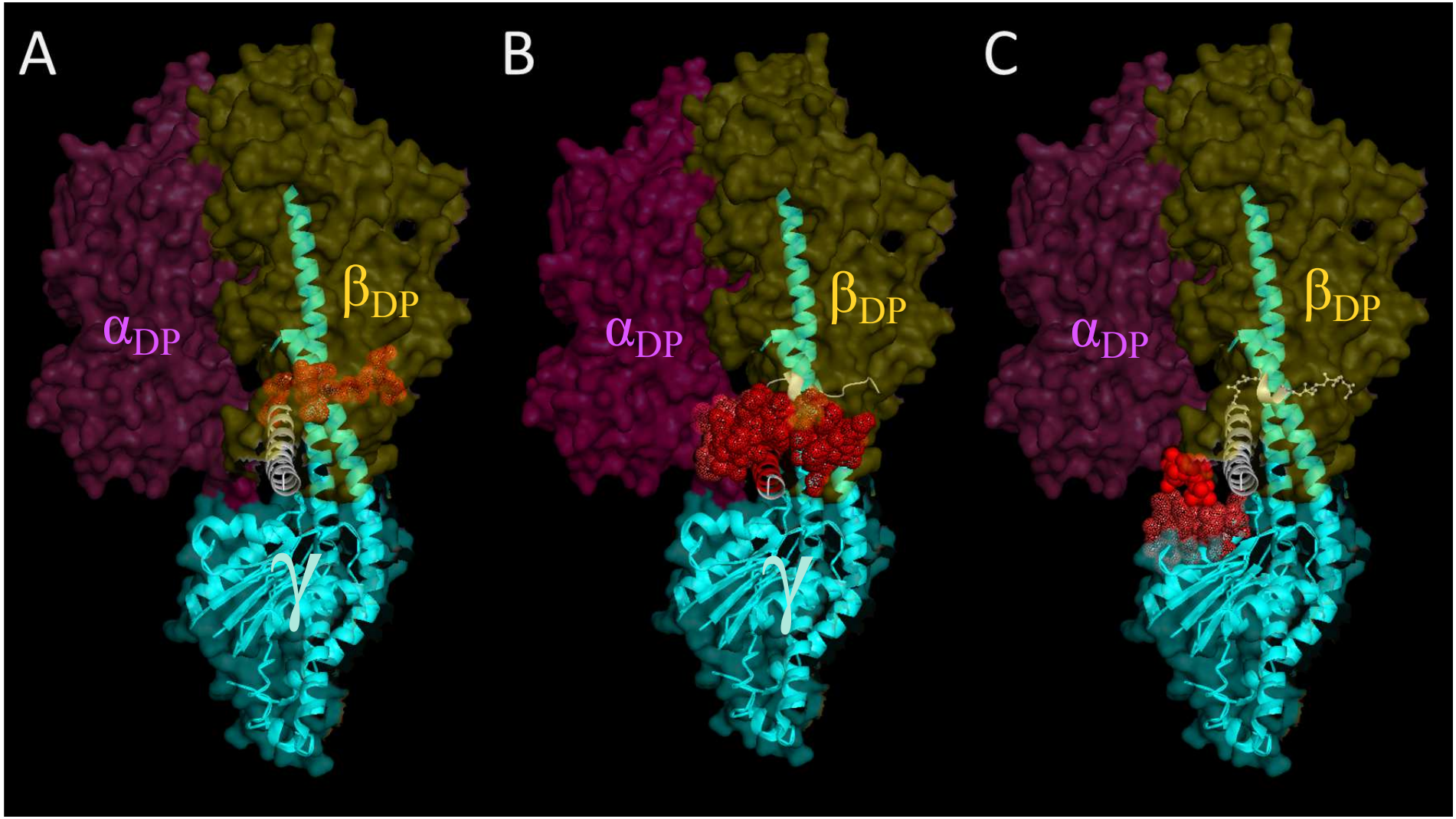


Figure 5.11: **Les trois clés de stabilisation du complexe inhibé IF1-F_1ATPase**. pdb : 2V7Q,[27]. En blanc, représentation cartoon, IF1 et en points rouge, les zones participant à la stabilisation du complexe inhibé IF1-F_1ATPase. (A) La partie N-terminale d'IF1 ne participe pas à le reconnaissance d'IF1 par l'ATP synthase mitochondriale mais son enroulement autour de la sous-unité γ participe à la stabilisation du complexe inhibé IF1/F_1-ATPase. (B) La fermeture de la paire catalytique α/β sur IF1 verrouille encage le peptide dans la cage F_1ATPasique. (C) La fermeture de la paire catalytique α/β sur IF1 provoque des zones de contacts entre les sous-unités α et γ. Ces interactions, qui n'impliquent pas directement le peptide IF1, sont la troisième clef de stabilisation du complexe inhibé IF1-F_1ATPase.

Perspectives. En réalité, il est difficile de pouvoir ordonner l'enroulement de la partie N-terminale autour de la sous-unité γ et le verrouillage du peptide par la fermeture des sites catalytiques et il serait même intéressant de voir si elles ont des effets complémentaires en étudiant l'inhibition d'ATPase modifiée dans la boucle α par des peptides tronqués en N-terminal. Si le K_i est inchangé alors les deux étapes sont indépendantes l'une de l'autre et si le K_i est modifié alors une des étapes est bien la conséquence de l'autre. Nous avions voulu créer des mutants ou la contrainte stérique α-γ soit encore plus réduite. Pour cela, des résidus de la sous-unité γ situés en face des résidus d'intérêt des sous-unités α et β ont récemment été mutés en glycine par Emmanuel Tetaud (CNRS, Bordeaux). Pour l'instant aucun de ces mutants ne semblent hélas pousser sur milieu respiratoire. D'autres expériences sur mitochondries entières pourraient compléter notre étude. En perçant les mitochondries à l'alaméthicine après incubation de celle-ci à pH 8,0 [74], il est possible d'observer le relargage du peptide. Aussi peut-on espérer voir des différences de relargage du peptide avec les mutants de la boucle α et les comparer avec les études effectuées avec notre peptide recombinant sur SMP.

Quatrième partie

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

La régulation de l'activité de l'ATP synthase, qu'elle soit orientée vers la synthèse ou l'hydrolyse d'ATP, est finement régulée. Pendant ces trois ans, la régulation de l'hydrolyse d'ATP par le peptide endogène IF1 a été abordée. En plus de son rôle inhibiteur de l'hydrolyse d'ATP, IF1 semble être impliqué dans la physiologie mitochondriale et cellulaire. Il a été proposé comme un des acteurs dans la stabilisation de l'oligomérisation des ATP synthases mitochondriales et participerait donc aussi à l'architecture mitochondriale. De nombreuses études physiologiques ont été entreprises et son rôle exact dans la cellule reste encore largement incompris. La régulation post-transcriptionnelle du peptide semble importante pour la régulation énergétique cellulaire [86][117][118][119] . Récemment plusieurs études ont montré que la surexpression d'IF1 dans les cellules cancéreuses entrainaît une diminution de l'activité ATPasique suggérant qu'IF1 serait capable d'inhiber la synthèse d'ATP et de participer à la régulation de la croissance des tumeurs. Même si ces études restent controversées, elles sont encourageantes pour la recherche de traitements contre le cancer [86][120]. Dans cette thèse, nous avons essayé de contribuer à la compréhension du mécanisme d'inhibition de l'ATP synthase par son peptide endogène. Ce travail a été fait sur *Saccharaomyces cerevisiae*, organisme de choix pour faciliter les nombreuses mutations qui ont été faites et extraire les ATP synthases sauvage ou mutées d'intérêt. Trois axes principaux peuvent se dégager de ce travail dans lequel la mutagenèse, les techniques de spectroscopie RPE et les cinétiques d'inhibition ont été utilisées.

- L'étude de l'oligomérisation du peptide IF1 de levure en recherchant l'interface de dimérisation sur la base structurale de l'IF1 bovin.
- La recherche des particularités des ATP synthases mitochondriales aussi bien dans le mécanisme d'action du peptide que dans l'existence de séquences présentes exclusivement dans les ATP synthases mitochondriales (α-^{193}GSDKEDDL^{201}).
- L'étude du mécanisme d'inhibition de l'ATPase par IF1 au niveau moléculaire

Les expériences préliminaires de CD et de RPE ont montré que contrairement à l'IF1 de bovin dont la structure 3D a été établie par Elena Cabezón en 2001, l'IF1 de levure ne semble pas être entièrement structuré en hélice α. Il existe sans doute des zones de flexibilité dans le peptide qui dépendent du pH [67][69][121] et qui permettent l'oligomérisation du peptide ou qui donnent au peptide son pouvoir inhibiteur. Les résultats RPE obtenus dans le Chapitre 1 sont préliminaires. Les spectres obtenus à température ambiante et à basse température sur les mutants IF1 E33C et IF1 L54C marqués au MTSL favorisent l'hypothèse de la dimérisation du peptide en région médiane. Cependant cette partie doit être approfondie notamment dans l'amélioration du taux de marquage qui est absolument essentielle pour l'interprétation des spectres. Une fois ce travail effectué, des mesures de DEER peuvent être envisagées sur le H39C marqué. Ces mesures pourront confirmer l'interface de dimérisation du peptide.

Dans cette thèse, nous avons aussi recherché la cause de la spécificité d'action d'IF1 envers les ATP synthases mitochondriales en sélectionnant et en mutant des résidus non loin d'IF1 dans le complexe inhibé [98] et présents uniquement dans les ATP synthases mitochondriales. Nous avons continué le travail de mutagenèse sur les sous-unité α et β qu'avaient initié Yuan Luo et Vincent Corvest. Les mutations effectuées sur la sous-unité α n'ont absolument eu aucun effet sur la phase de reconnaissance du peptide par l'enzyme. En revanche la mutation des résidus β471 et β474

ont diminué considérablement la reconnaissance du peptide par l'enzyme mais n'ont pas annulé totalement le caractère inhibiteur du peptide. La reconnaissance de l'enzyme se fait sans doute exclusivement grâce à des résidus présents sur la sous-unité β ou sur des résidus de α et β situés plus en périphérie de la partie F_1-ATPase. Enfin, le rôle de la séquence "GSKEDDDL", présente uniquement dans la séquence de la sous-unité α des ATP synthases mitochondriales a été examiné mais ce travail n'a malheureusement pas été concluant.

L'étude du mécanisme d'inhibition a permis de montrer le rôle de la partie N-terminale d'IF1. Celle ci n'est pas impliquée dans la reconnaissance d'IF1 par l'enzyme. IF1 se présente à l'enzyme par sa partie médiane, la partie N-terminale probablement repliée vers l'arrière, celle-ci ne venant s'enrouler autour de la sous-unité γ qu'une fois le peptide fixé sur l'enzyme. Les points de stabilisation du complexe inhibé sont nombreux. La partie N-terminale d'IF1 et plus particulièrement les résidus 15, 16 et 17 ont été montrés comme étant nécessaires à la stabilisation du complexe inhibé. Quelques résidus situés en région médiane du peptide stabilisent aussi le complexe inhibé [66][92].

Enfin, nous avons mis en évidence de nouvelles interactions nécessaires à la stabilisation du complexe inhibé. Malgré leur distance par rapport au site de fixation d'IF1 [98], ces zones de contacts et plus particulièrement le contact α-γ semblent important dans la stabilisation du complexe IF1-F_1 car la réduction de ces zones de contact entraine une diminution de l'affinité du peptide pour l'enzyme.

PERSPECTIVES

Comme on l'a vu dans cette étude, nos connaissances sur le mécanisme d'inhibition restent encore incomplètes. De nombreuses questions restent à élucider :

- Le travail sur l'oligomérisation du peptide de levure par marquage de spin doit être approfondi. Pour l'instant nous n'avons appliqué la technique de marquage de spin qu'avec l'étude de l'oligomérisation du peptide IF1. Mais il serait intéressant d'utiliser cet outil puissant pour préciser le mécanisme d'inhibition de l'ATPase par IF1 car, contrairement à la cristallographie, il permet de regarder la dynamique d'interaction des protéines. Initialement, l'idée avait été d'utiliser cette technique pour compléter l'étude sur le rôle de la partie N-terminale d'IF1 dans le mécanisme d'inhibition. En effet, il aurait été intéressant de greffer un marqueur en la partie N-terminale du peptide de façon à pouvoir voir dans un premier temps si cette addition provoquait des changements spectraux, à température ambiante, dus à l'interaction IF1-F1-ATPase. On aurait pu imaginer étudier l'éventuelle restructuration du peptide au contact de l'enzyme. On pourrait également envisager de placer deux marqueurs sur le peptide de façon à pouvoir mesurer des distances (DEER) entre ces deux marqueurs et d'évaluer la variation de ces distances lors du contact du peptide avec l'enzyme. Au vu de nos résultats sur l'étude de marquage de spin et de la difficulté à marquer les peptides d'IF1, il faut pourtant bien être conscient que ces expériences ne seront pas faciles à réaliser. En effet, comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, le marquage du peptide fera l'objet d'un premier "challenge", l'ajout de deux sondes ne facilitant pas l'étude, bien sûr. Enfin, la maîtrise de la concentration en peptide est essentielle pour éviter toute interaction entre les peptides d'IF1 (Kd = 6 μM à pH 6,5). Ceci impliquerait de travailler avec des concentrations faibles (10μM) en enzymes et en IF1.
- En ce qui concerne la spécificité d'interaction, il faudrait poursuivre les mutations sur les sous-unités α et β.
- Enfin, des données récentes encore non publiées montrent que le peptide IF1 de levure est intercalé entre des sous-unité α_{DP} et β_{DP} qui n'ont pas encore libéré le phosphate inorganique suggérant que le mécanisme d'inhibition de l'ATPase de levure diffère de celui du bovin (communication personnelle : Graham Robinson). Pour déterminer si le mécanisme d'inhibition est semblable dans toutes les ATPases mitochondriales, il serait intéressant de cristalliser un complexe inhibé hybride ATPase bovine-IF1 de levure de manière à voir si les mêmes états catalytiques sont piégés lors de l'inhibition.

Bibliographie

[1] G A Perkins and T G Frey. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. Micron (Oxford, England : 1993), 31(1) :97–111, January 2000. PMID : 10568232.

[2] Michel Rigoulet, Arnaud Mourier, Anne Galinier, Louis Casteilla, and Anne Devin. Electron competition process in respiratory chain : regulatory mechanisms and physiological functions. Biochimica Et Biophysica Acta, 1797(6-7) :671–677, July 2010. PMID : 20117078.

[3] Rouslan G Efremov, Rozbeh Baradaran, and Leonid A Sazanov. The architecture of respiratory complex i. Nature, 465(7297) :441–445, May 2010. PMID : 20505720.

[4] Alain Dautant, Jean Velours, and Marie-France Giraud. Crystal structure of the Mg·ADP-inhibited state of the yeast F1c10-ATP synthase. Journal of Biological Chemistry, 285(38) :29502 –29510, 2010.

[5] Daniela Stock, Andrew G. W. Leslie, and John E. Walker. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science, 286(5445) :1700 –1705, November 1999.

[6] J C Long, S Wang, and S B Vik. Membrane topology of subunit a of the F1F0 ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues. The Journal of Biological Chemistry, 273(26) :16235–16240, June 1998. PMID : 9632682.

[7] H Jäger, R Birkenhäger, W D Stalz, K Altendorf, and G Deckers-Hebestreit. Topology of subunit a of the escherichia coli ATP synthase. European Journal of Biochemistry / FEBS, 251(1-2) :122–132, January 1998. PMID : 9492276.

[8] R H Fillingame, W Jiang, and O Y Dmitriev. The oligomeric subunit c rotor in the fo sector of ATP synthase : unresolved questions in our understanding of function. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 32(5) :433–439, October 2000. PMID : 15254378.

[9] S Marzuki, L C Watkins, and W M Choo. Mitochondrial H+-ATPase in mutants of saccharomyces cerevisiae with defective subunit 8 of the enzyme complex. Biochimica Et Biophysica Acta, 975(2) :222–230, July 1989. PMID : 2525929.

[10] R J Devenish, M Prescott, G M Boyle, and P Nagley. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase : OSCP and the proton channel. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 32(5) :507–515, October 2000. PMID : 15254386.

[11] R G Hadikusumo, S Meltzer, W M Choo, M J Jean-François, A W Linnane, and S Marzuki. The definition of mitochondrial h+ ATPase assembly defects in mit- mutants of saccharomyces cerevisiae with a monoclonal antibody to the enzyme complex as an assembly probe. Biochimica Et Biophysica Acta, 933(1) :212–222, March 1988. PMID : 2894858.

[12] N Norais, D Promé, and J Velours. ATP synthase of yeast mitochondria. characterization of subunit d and sequence analysis of the structural gene ATP7. The Journal of Biological Chemistry, 266(25) :16541–16549, September 1991. PMID : 1832157.

[13] C Spannagel, J Vaillier, G Arselin, P V Graves, and J Velours. The subunit f of mitochondrial yeast ATP synthase–characterization of the protein and disruption of the structural gene ATP17. European Journal of Biochemistry / FEBS, 247(3) :1111–1117, August 1997. PMID : 9288937.

[14] J Velours, J Vaillier, P Paumard, V Soubannier, J Lai-Zhang, and D M Mueller. Bovine coupling factor 6, with just 14.5% shared identity, replaces subunit h in the yeast ATP synthase. The Journal of Biological Chemistry, 276(11) :8602–8607, March 2001. PMID : 11083870.

[15] I Arnold, K Pfeiffer, W Neupert, R A Stuart, and H Schägger. ATP synthase of yeast mitochondria. isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene. The Journal of Biological Chemistry, 274(1) :36–40, January 1999. PMID : 9867807.

[16] Rémi Fronzes, Théodore Weimann, Jacques Vaillier, Jean Velours, and Daniel Brèthes. The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. Biochemistry, 45(21) :6715–6723, May 2006. PMID : 16716082.

[17] C Gibbons, M G Montgomery, A G Leslie, and J E Walker. The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 a resolution. Nature Structural Biology, 7(11) :1055–1061, November 2000. PMID : 11062563.

[18] M Saraste, N J Gay, A Eberle, M J Runswick, and J E Walker. The atp operon : nucleotide sequence of the genes for the gamma, beta, and epsilon subunits of escherichia coli ATP synthase. Nucleic Acids Research, 9(20) :5287–5296, October 1981. PMID : 6272217.

[19] J E Walker, M J Runswick, and M Saraste. Subunit equivalence in escherichia coli and bovine heart mitochondrial F1F0 ATPases. FEBS Letters, 146(2) :393–396, September 1982. PMID : 6216120.

[20] J E Walker, M Saraste, M J Runswick, and N J Gay. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. The EMBO Journal, 1(8) :945–951, 1982. PMID : 6329717.

[21] H Shen, B Y Yao, and D M Mueller. Primary structural constraints of p-loop of mitochondrial F1-ATPase from yeast. The Journal of Biological Chemistry, 269(13) :9424–9428, April 1994. PMID : 8144526.

[22] S D Watts, Y Zhang, R H Fillingame, and R A Capaldi. The gamma subunit in the escherichia coli ATP synthase complex (ECF1F0) extends through the stalk and contacts the c subunits of the f0 part. FEBS Letters, 368(2) :235–238, July 1995. PMID : 7628612.

[23] E Guélin, J Chevallier, M Rigoulet, B Guérin, and J Velours. ATP synthase of yeast mitochondria. isolation and disruption of the ATP epsilon gene. The Journal of Biological Chemistry, 268(1) :161–167, January 1993. PMID : 8416924.

[24] J P Abrahams, A G Leslie, R Lutter, and J E Walker. Structure at 2.8 a resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. Nature, 370(6491) :621–628, August 1994. PMID : 8065448.

[25] R A Capaldi. F1-ATPase in a spin. Nature Structural Biology, 1(10) :660–663, October 1994. PMID : 7634064.

[26] Elena Cabezon, Martin G Montgomery, Andrew G W Leslie, and John E Walker. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. Nat Struct Mol Biol, 10(9) :744–750, 2003.

[27] Jonathan R Gledhill, Martin G Montgomery, Andrew G W Leslie, and John E Walker. How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(40) :15671–15676, October 2007. PMID : 17895376.

[28] Jonathan R Gledhill, Martin G Montgomery, Andrew G W Leslie, and John E Walker. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(34) :13632–13637, August 2007. PMID : 17698806.

[29] R I Menz, J E Walker, and A G Leslie. Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites : implications for the mechanism of rotary catalysis. Cell, 106(3) :331–341, August 2001. PMID : 11509182.

[30] Venkataraman Kabaleeswaran, Hong Shen, Jindrich Symersky, John E Walker, Andrew G W Leslie, and David M Mueller. Asymmetric structure of the yeast f1 ATPase in the absence of bound nucleotides. The Journal of Biological Chemistry, 284(16) :10546–10551, April 2009. PMID : 19233840.

[31] Malgorzata Rak, Samanta Gokova, and Alexander Tzagoloff. Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. The EMBO Journal, 30(5) :920–930, March 2011. PMID : 21266956.

[32] Malgorzata Rak, Xiaomei Zeng, Jean-Jacques Brière, and Alexander Tzagoloff. Assembly of f0 in saccharomyces cerevisiae. Biochimica Et Biophysica Acta, 1793(1) :108–116, January 2009. PMID : 18672007.

[33] Malgorzata Rak and Alexander Tzagoloff. F1-dependent translation of mitochondrially encoded atp6p and atp8p subunits of yeast ATP synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(44) :18509–18514, November 2009. PMID : 19841266.

[34] Isabel Arnold, Matthias F. Bauer, Michael Brunner, Walter Neupert, and Rosemary A. Stuart. Yeast mitochondrial F1F0-ATPase : the novel subunit e is identical to tim11. FEBS Letters, 411(2-3) :195–200, July 1997.

[35] I Arnold, K Pfeiffer, W Neupert, R A Stuart, and H Schägger. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer : identification of three dimer-specific subunits. The EMBO Journal, 17(24) :7170–7178, December 1998. PMID : 9857174.

[36] G M Boyle, X Roucou, P Nagley, R J Devenish, and M Prescott. Identification of subunit g of yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. European Journal of Biochemistry / FEBS, 262(2) :315–323, June 1999. PMID : 10336613.

[37] Patrick Paumard, Jacques Vaillier, Bénédicte Coulary, Jacques Schaeffer, Vincent Soubannier, David M Mueller, Daniel Brèthes, Jean-Paul di Rago, and Jean Velours. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. The EMBO Journal, 21(3) :221–230, February 2002. PMID : 11823415.

[38] Paul D Gavin, Mark Prescott, and Rodney J Devenish. F1F0-ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 37(2) :55–66, April 2005. PMID : 15906150.

[39] Daniel Thomas, Patrick Bron, Théodore Weimann, Alain Dautant, Marie-France Giraud, Patrick Paumard, Bénédicte Salin, Annie Cavalier, Jean Velours, and Daniel Brèthes. Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. Biology of the Cell, 100(10) :591, October 2008.

[40] S P Tsunoda, R Aggeler, M Yoshida, and R A Capaldi. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F1Fo ATP synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(3) :898–902, January 2001. PMID : 11158567.

[41] Toshiharu Suzuki, Hiroshi Ueno, Noriyo Mitome, Junko Suzuki, and Masasuke Yoshida. F(0) of ATP synthase is a rotary proton channel. obligatory coupling of proton translocation with rotation of c-subunit ring. The Journal of Biological Chemistry, 277(15) :13281–13285, April 2002. PMID : 11815616.

[42] H Noji, R Yasuda, M Yoshida, and Jr Kinosita, K. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. Nature, 386(6622) :299–302, March 1997. PMID : 9069291.

[43] Y Sambongi, Y Iko, M Tanabe, H Omote, A Iwamoto-Kihara, I Ueda, T Yanagida, Y Wada, and M Futai. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1) : direct observation. Science (New York, N.Y.), 286(5445) :1722–1724, November 1999. PMID : 10576736.

[44] W Junge, H Lill, and S Engelbrecht. ATP synthase : an electrochemical transducer with rotatory mechanics. Trends in Biochemical Sciences, 22(11) :420–423, November 1997. PMID : 9397682.

[45] S B Vik and B J Antonio. A mechanism of proton translocation by F1F0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. The Journal of Biological Chemistry, 269(48) :30364–30369, December 1994. PMID : 7982950.

[46] S B Vik, J C Long, T Wada, and D Zhang. A model for the structure of subunit a of the escherichia coli ATP synthase and its role in proton translocation. Biochimica Et Biophysica Acta, 1458(2-3) :457–466, May 2000. PMID : 10838058.

[47] Takayuki Nishizaka, Kazuhiro Oiwa, Hiroyuki Noji, Shigeki Kimura, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida, and Jr Kinosita, Kazuhiko. Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. Nature Structural & Molecular Biology, 11(2) :142–148, February 2004. PMID : 14730353.

[48] Daichi Okuno, Ryota Iino, and Hiroyuki Noji. Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. Journal of Biochemistry, 149(6) :655–664, June 2011. PMID : 21524994.

[49] Hiroyasu Itoh, Akira Takahashi, Kengo Adachi, Hiroyuki Noji, Ryohei Yasuda, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita. Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. Nature, 427(6973) :465–468, January 2004. PMID : 14749837.

[50] J Weber and A E Senior. Bi-site catalysis in F1-ATPase : does it exist ? The Journal of Biological Chemistry, 276(38) :35422–35428, September 2001. PMID : 11451960.

[51] J J García and R A Capaldi. Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in escherichia coli F1-ATPase. The Journal of Biological Chemistry, 273(26) :15940–15945, June 1998. PMID : 9632641.

[52] J Weber, S Wilke-Mounts, R S Lee, E Grell, and A E Senior. Specific placement of tryptophan in the catalytic sites of escherichia coli F1-ATPase provides a direct probe of nucleotide

binding : maximal ATP hydrolysis occurs with three sites occupied. The Journal of Biological Chemistry, 268(27) :20126–20133, September 1993. PMID : 8376371.

[53] J Weber and A E Senior. Catalytic mechanism of F1-ATPase. Biochimica Et Biophysica Acta, 1319(1) :19–58, March 1997. PMID : 9107315.

[54] Y M Milgrom, M B Murataliev, and P D Boyer. Bi-site activation occurs with the native and nucleotide-depleted mitochondrial F1-ATPase. The Biochemical Journal, 330 (Pt 2) :1037–1043, March 1998. PMID : 9480927.

[55] Yakov M Milgrom and Richard L Cross. Rapid hydrolysis of ATP by mitochondrial F1-ATPase correlates with the filling of the second of three catalytic sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(39) :13831–13836, September 2005. PMID : 16172372.

[56] Vladimir V Bulygin and Yakov M Milgrom. A bi-site mechanism for escherichia coli F1-ATPase accounts for the observed positive catalytic cooperativity. Biochimica Et Biophysica Acta, 1787(8) :1016–1023, August 2009. PMID : 19269272.

[57] Y M Milgrom, L L Ehler, and P D Boyer. ATP binding at noncatalytic sites of soluble chloroplast F1-ATPase is required for expression of the enzyme activity. The Journal of Biological Chemistry, 265(31) :18725–18728, November 1990. PMID : 2146260.

[58] D A Bullough, E A Ceccarelli, J G Verburg, and W S Allison. Localization of sites modified during inactivation of the bovine heart mitochondrial F1-ATPase by quinacrine mustard using [3H]aniline as a probe. The Journal of Biological Chemistry, 264(16) :9155–9163, June 1989. PMID : 2524484.

[59] A Di Pietro, F Penin, C Godinot, and D C Gautheron. "Hysteric" behavior and nucleotide binding sites of pig heart mitochondrial f1 adenosine 5'-triphosphatase. Biochemistry, 19(25) :5671–5678, December 1980. PMID : 6450613.

[60] A Di Pietro, C Godinot, and D C Gautheron. Interaction between catalytic and regulatory sites of mitochondrial f1 adenosine-5'-triphosphatase as monitored by the differential effects of inhibitors and nucleotide analogues on the "hysteretic" behavior of the enzyme. Biochemistry, 20(22) :6312–6318, October 1981. PMID : 6458328.

[61] D Bald, T Amano, E Muneyuki, B Pitard, J L Rigaud, J Kruip, T Hisabori, M Yoshida, and M Shibata. ATP synthesis by F0F1-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. The Journal of Biological Chemistry, 273(2) :865–870, January 1998. PMID : 9422743.

[62] P Richard, B Pitard, and J L Rigaud. ATP synthesis by the F0F1-ATPase from the thermophilic bacillus PS3 co-reconstituted with bacteriorhodopsin into liposomes. evidence for stimulation of ATP synthesis by ATP bound to a noncatalytic binding site. The Journal of Biological Chemistry, 270(37) :21571–21578, September 1995. PMID : 7665570.

[63] M E PULLMAN and G C MONROY. A NATURALLY OCCURRING INHIBITOR OF MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE. The Journal of Biological Chemistry, 238 :3762–3769, November 1963. PMID : 14109217.

[64] T Hashimoto, Y Yamamoto, Y Yoshida, and K Tagawa. Cleavage of bovine mitochondrial ATPase inhibitor with endopeptidases, and binding of the resulting peptides to the interface between the alpha- and beta-subunits of F1ATPase. Journal of Biochemistry, 117(3) :641–647, March 1995. PMID : 7629035.

[65] M J van Raaij, J P Abrahams, A G Leslie, and J E Walker. The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin b. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(14) :6913–6917, July 1996. PMID : 8692918.

[66] M J van Raaij, G L Orriss, M G Montgomery, M J Runswick, I M Fearnley, J M Skehel, and J E Walker. The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria : the minimal inhibitory sequence. Biochemistry, 35(49) :15618–15625, December 1996. PMID : 8961923.

[67] E Cabezon, P J Butler, M J Runswick, and J E Walker. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. The Journal of Biological Chemistry, 275(33) :25460–25464, August 2000. PMID : 10831597.

[68] E Cabezón, I Arechaga, P Jonathan, G Butler, and J E Walker. Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. The Journal of Biological Chemistry, 275(37) :28353–28355, September 2000. PMID : 10918052.

[69] E Cabezón, M J Runswick, A G Leslie, and J E Walker. The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. The EMBO Journal, 20(24) :6990–6996, December 2001. PMID : 11742976.

[70] Franco Zanotti, Gabriella Raho, Rita Vuolo, Antonio Gaballo, Francesco Papa, and Sergio Papa. Functional domains of the ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria. FEBS Letters, 482(1-2) :163–166, September 2000.

[71] Franco Zanotti, Gabriella Raho, Antonio Gaballo, and Sergio Papa. Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 36(5) :447–457, October 2004. PMID : 15534392.

[72] Cesira de Chiara, Giuseppe Nicastro, Alberto Spisni, Franco Zanotti, Tiziana Cocco, and Sergio Papa. Activity and NMR structure of synthetic peptides of the bovine ATPase inhibitor protein, IF1. Peptides, 23(12) :2127–2141, December 2002. PMID : 12535691.

[73] Elena Cabezon, P Jonathan G Butler, Michael J Runswick, Rodrigo J Carbajo, and John E Walker. Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. The Journal of Biological Chemistry, 277(44) :41334–41341, November 2002. PMID : 12186878.

[74] Renée Venard, Daniel Brèthes, Marie-France Giraud, Jacques Vaillier, Jean Velours, and Francis Haraux. Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. Biochemistry, 42(24) :7626–7636, June 2003. PMID : 12809520.

[75] T Hashimoto, Y Yoshida, and K Tagawa. Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. Journal of Biochemistry, 108(1) :17–20, July 1990. PMID : 2172220.

[76] Sangjin Hong and Peter L Pedersen. ATP synthase of yeast : structural insight into the different inhibitory potencies of two regulatory peptides and identification of a new potential regulator. Archives of Biochemistry and Biophysics, 405(1) :38–43, September 2002. PMID : 12176055.

[77] Ryota Iino, Rie Hasegawa, Kazuhito V Tabata, and Hiroyuki Noji. Mechanism of inhibition by c-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of escherichia coli FoF1-ATP synthase. The Journal of Biological Chemistry, 284(26) :17457–17464, June 2009. PMID : 19411254.

[78] Gino Cingolani and Thomas M Duncan. Structure of the ATP synthase catalytic complex (F(1)) from escherichia coli in an autoinhibited conformation. Nature Structural & Molecular Biology, 18(6) :701–707, June 2011. PMID : 21602818.

[79] S P Tsunoda, A J Rodgers, R Aggeler, M C Wilce, M Yoshida, and R A Capaldi. Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(12) :6560–6564, June 2001. PMID : 11381110.

[80] Hiromasa Yagi, Nobumoto Kajiwara, Hideaki Tanaka, Tomitake Tsukihara, Yasuyuki Kato-Yamada, Masasuke Yoshida, and Hideo Akutsu. Structures of the thermophilic F1-ATPase epsilon subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its c-terminal domain in f1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(27) :11233–11238, July 2007. PMID : 17581881.

[81] Toshiharu Suzuki, Chiaki Wakabayashi, Kazumi Tanaka, Boris A Feniouk, and Masasuke Yoshida. Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F(o)F(1)-ATP synthase by epsilon-subunit. The Journal of Biological Chemistry, 286(19) :16807–16813, May 2011. PMID : 21454506.

[82] Satoshi Iizuka, Shigeyuki Kato, Masasuke Yoshida, and Yasuyuki Kato-Yamada. gammaepsilon sub-complex of thermophilic ATP synthase has the ability to bind ATP. Biochemical and Biophysical Research Communications, 349(4) :1368–1371, November 2006. PMID : 16982032.

[83] K E Polgreen, J Featherstone, A C Willis, and D A Harris. Primary structure and properties of the inhibitory protein of the mitochondrial ATPase (H(+)-ATP synthase) from potato. Biochimica Et Biophysica Acta, 1229(2) :175–180, April 1995. PMID : 7727496.

[84] K Schwerzmann and P L Pedersen. Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. Archives of Biochemistry and Biophysics, 250(1) :1–18, October 1986. PMID : 2876680.

[85] Ilka Wittig, Bjoern Meyer, Heinrich Heide, Mirco Steger, Lea Bleier, Zibiernisha Wumaier, Michael Karas, and Hermann Schägger. Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. Biochimica Et Biophysica Acta, 1797(6-7) :1004–1011, July 2010. PMID : 20188060.

[86] Laura Sánchez-Cenizo, Laura Formentini, Marcos Aldea, Alvaro D Ortega, Paula García-Huerta, María Sánchez-Aragó, and José M Cuezva. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H+-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a warburg phenotype. The Journal of Biological Chemistry, 285(33) :25308–25313, August 2010. PMID : 20538613.

[87] Naoki Ichikawa and Miki Mizuno. Functional expression of hexahistidine-tagged beta-subunit of yeast F1-ATPase and isolation of the enzyme by immobilized metal affinity chromatography. Protein Expression and Purification, 37(1) :97–101, September 2004. PMID : 15294286.

[88] Mikhail Galkin, Renée Venard, Jacques Vaillier, Jean Velours, and Francis Haraux. Functional transitions of F0F1-ATPase mediated by the inhibitory peptide IF1 in yeast coupled submitochondrial particles. European Journal of Biochemistry / FEBS, 271(10) :1963–1970, May 2004. PMID : 15128305.

[89] Vincent Corvest, Claude Sigalat, Renée Venard, Pierre Falson, David M Mueller, and Francis Haraux. The binding mechanism of the yeast F1-ATPase inhibitory peptide : role of catalytic

intermediates and enzyme turnover. The Journal of Biological Chemistry, 280(11) :9927–9936, March 2005. PMID : 15640141.

[90] Vincent Corvest, Claude Sigalat, and Francis Haraux. Insight into the bind-lock mechanism of the yeast mitochondrial ATP synthase inhibitory peptide. Biochemistry, 46(29) :8680–8688, July 2007. PMID : 17595113.

[91] Tiona Andrianaivomananjaona, Martin Moune-Dimala, Sameh Herga, Violaine David, and Francis Haraux. How the n-terminal extremity of saccharomyces cerevisiae IF1 interacts with ATP synthase : a kinetic approach. Biochimica Et Biophysica Acta, 1807(2) :197–204, February 2011. PMID : 20951672.

[92] John V. Bason, Michael J. Runswick, Ian M. Fearnley, and John E. Walker. Binding of the inhibitor protein IF1 to bovine F1-ATPase. Journal of Molecular Biology, 406(3) :443–453, February 2011.

[93] R Schnizer, G Van Heeke, D Amaturo, and S M Schuster. Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F1-ATPase inhibitor protein. Biochimica Et Biophysica Acta, 1292(2) :241–248, February 1996. PMID : 8597569.

[94] H Matsubara, T Hase, T Hashimoto, and K Tagawa. Amino acid sequence of an intrinsic inhibitor of mitochondrial ATPase from yeast. Journal of Biochemistry, 90(4) :1159–1165, October 1981. PMID : 6458601.

[95] Y Yoshida, T Sato, T Hashimoto, N Ichikawa, S Nakai, H Yoshikawa, F Imamoto, and K Tagawa. Isolation of a gene for a regulatory 15-kDa subunit of mitochondrial F1F0-ATPase and construction of mutant yeast lacking the protein. European Journal of Biochemistry / FEBS, 192(1) :49–53, August 1990. PMID : 2169416.

[96] Naoki Ichikawa, Ayako Karaki, Miho Kawabata, Saori Ushida, Mika Mizushima, and Tadao Hashimoto. The region from phenylalanine-17 to phenylalanine-28 of a yeast mitochondrial ATPase inhibitor is essential for its ATPase inhibitory activity. Journal of Biochemistry, 130(5) :687 –693, November 2001.

[97] Gino Cingolani and Thomas M Duncan. Structure of the ATP synthase catalytic complex (F1) from escherichia coli in an autoinhibited conformation. Nature Structural & Molecular Biology, May 2011.

[98] J. R. Gledhill, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker. How the regulatory protein, IF1, inhibits F1-ATPase from bovine mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(40) :15671–15676, October 2007.

[99] J E Walker, M Saraste, and N J Gay. The unc operon. nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. Biochimica Et Biophysica Acta, 768(2) :164–200, September 1984. PMID : 6206892.

[100] R S Lee, J Pagan, M Satre, P V Vignais, and A E Senior. Identification of a mutation in escherichia coli F1-ATPase beta-subunit conferring resistance to aurovertin. FEBS Letters, 253(1-2) :269–272, August 1989. PMID : 2527166.

[101] Jérôme Santolini, Claire Minoletti, Jean-Marie Gomis, Claude Sigalat, François André, and Francis Haraux. An insight into the mechanism of inhibition and reactivation of the F(1)-ATPases by tentoxin. Biochemistry, 41(19) :6008–6018, May 2002. PMID : 11993995.

[102] Paul D Gavin, Mark Prescott, Susan E Luff, and Rodney J Devenish. Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae. Journal of Cell Science, 117(Pt 11) :2333–2343, May 2004. PMID : 15126633.

[103] Mary Dienhart, Kathy Pfeiffer, Hermann Schagger, and Rosemary A Stuart. Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, inh1. The Journal of Biological Chemistry, 277(42) :39289–39295, October 2002. PMID : 12167646.

[104] Lara Tomasetig, Francesca Di Pancrazio, David A Harris, Irene Mavelli, and Giovanna Lippe. Dimerization of F0F1ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1. Biochimica Et Biophysica Acta, 1556(2-3) :133–141, December 2002. PMID : 12460670.

[105] Ilka Wittig, Rosalba Carrozzo, Filippo M Santorelli, and Hermann Schägger. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochimica Et Biophysica Acta, 1757(9-10) :1066–1072, October 2006. PMID : 16782043.

[106] Venkataraman Kabaleeswaran, Neeti Puri, John E Walker, Andrew G W Leslie, and David M Mueller. Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast f1 ATPase. The EMBO Journal, 25(22) :5433–5442, November 2006. PMID : 17082766.

[107] A C Dianoux and J M Freyssinet. Specific fragmentation of natural inhibitor of mitochondrial ATPase by thrombin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 107(2) :435–441, July 1982. PMID : 6215037.

[108] A C Dianoux, A Tsugita, G Klein, and P V Vignais. Effects of proteolytic fragmentations on the activity of the mitochondrial natural ATPase inhibitor. FEBS Letters, 140(2) :223–228, April 1982. PMID : 6211370.

[109] J S Stout, B E Partridge, D A Dibbern, and S M Schuster. Peptide analogs of the beef heart mitochondrial F1-ATPase inhibitor protein. Biochemistry, 32(29) :7496–7502, July 1993. PMID : 8338848.

[110] M S Lebowitz and P L Pedersen. Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase : relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 330(2) :342–354, June 1996. PMID : 8660664.

[111] John V. Bason, Graham C. Robinson, Michael J. Runswick, Ian M. Fearnley, and John E. Walker. Binding of the inhibitor proteins IF1 to mitochondrial F1-ATPases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1797(Supplement 1) :28, July 2010.

[112] K Y Hara, H Noji, D Bald, R Yasuda, Jr Kinosita, K, and M Yoshida. The role of the DELSEED motif of the beta subunit in rotation of F1-ATPase. The Journal of Biological Chemistry, 275(19) :14260–14263, May 2000. PMID : 10799504.

[113] Nelli Mnatsakanyan, Arathianand M. Krishnakumar, Toshiharu Suzuki, and Joachim Weber. The role of the DELSEED-loop of ATP synthase. Journal of Biological Chemistry, 284(17) :11336 –11345, April 2009.

[114] K Y Hara, Y Kato-Yamada, Y Kikuchi, T Hisabori, and M Yoshida. The role of the betaDELSEED motif of F1-ATPase : propagation of the inhibitory effect of the epsilon subunit. The Journal of Biological Chemistry, 276(26) :23969–23973, June 2001. PMID : 11279233.

[115] Toshiharu Suzuki, Tomoe Murakami, Ryota Iino, Junko Suzuki, Sakurako Ono, Yasuo Shirakihara, and Masasuke Yoshida. F0F1-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. The Journal of Biological Chemistry, 278(47) :46840–46846, November 2003. PMID : 12881515.

[116] Boris A Feniouk, Toshiharu Suzuki, and Masasuke Yoshida. Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit epsilon in bacterial ATP synthase. The Journal of Biological Chemistry, 282(1) :764–772, January 2007. PMID : 17092944.

[117] Michelangelo Campanella, Nadeene Parker, Choon Hong Tan, Andrew M Hall, and Michael R Duchen. IF(1) : setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase. Trends in Biochemical Sciences, 34(7) :343–350, July 2009. PMID : 19559621.

[118] Michelangelo Campanella, Andreas Seraphim, Rosella Abeti, Edward Casswell, Pedro Echave, and Michael R Duchen. IF1, the endogenous regulator of the F(1)F(o)-ATPsynthase, defines mitochondrial volume fraction in HeLa cells by regulating autophagy. Biochimica Et Biophysica Acta, 1787(5) :393–401, May 2009. PMID : 19269273.

[119] Valentina Giorgio, Elena Bisetto, Raffaella Franca, David A Harris, Sabina Passamonti, and Giovanna Lippe. The ectopic F(O)F(1) ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor protein IF1. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 42(2) :117–123, April 2010. PMID : 20180002.

[120] Imke M Willers and José M Cuezva. Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H(+)-ATP synthase : A key regulator of the metabolic phenotype in cancer. Biochimica Et Biophysica Acta, 1807(6) :543–551, June 2011. PMID : 21035425.

[121] L Domínguez-Ramírez, G Mendoza-Hernandez, A Carabez-Trejo, A Gómez-Puyou, and M Tuena de Gómez-Puyou. Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial f1-inhibitor protein complexes. FEBS Letters, 507(2) :191–194, October 2001. PMID : 11684096.

Cinquième partie

Article publié

ABSTRACT

The F-type ATPase or ATP synthase, anchored to the inner mitochondrial membrane, is a macromolecular complex using the proton motive force (*pmf*) generated by the oxydation of small molecules, such as $NADH_2$ and $FADH_2$, in the different respiratory complexes to form ATP. The *pmf* is converted into mechanical work by the clockwise rotation of the ATP synthase viewed from the membrane. The γ rotation successively distorts the three catalytic interfaces of the enzyme to allow the synthesis of ATP. Anoxia or hypoxia are cases in which the rotation of ATP synthase proceeds in the direction of ATP hydrolysis. A small peptide named IF1, 63 aminoacids-long in yeast and 84 aminoacids-long in bovine, specifically inhibits the mitochondrial ATP synthase in the direction of ATP hydrolysis. This inhibition is reversible since the peptide is released when the inner mitochondrial membrane is re-energized.

In this work, we were interested in characterizing the inhibition mechanism of the mitochondrial ATP synthase of *S.cerevisiae* by its endogenous peptide IF1. To elaborate and strengthen our statements, we mainly used the structures of IF1 ant of the inhibited IF1-F_1-ATPase complex of *B.taurus*.

The data obtained by Elena Cabezón on bovine and yeast IF1 showed that different forms of the peptide coexist and that their pre-eminence depends on the pH. The bovine IF1 mainly adopts a dimeric form at pH below 6.5 and tetrameric one at pH above 6.5. Its inhibitory properties also vary with the pH. The dimeric form is inhibitory and the tetrameric one is not. In yeast, it is known that a monomeric form is predominant at pH above 6.5 and a dimeric form predominant at pH below 6.5. The monomeric form is inhibitory but nothing has been reported about the inhibitory properties of the dimeric form. By using ths structural data of the bovine IF1, we tried to determine the dimerization region of the yeast IF1. For this aim, we decided to combine Site-Directed Spin Labeling (SDSL) with electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Thus, we attached labels on the C-ter or the mid-region and we could propose that the dimer of yeast IF1 preferentially forms by the mid-region. This work is currently in the preliminary stage and other experiments would be necessary to confirm the precize region of dimerization.

In a second part, we tried to precise the inhibitory mechanism by detailing the different steps of recognition, locking and stabilization of the inhibited complex. This was achieved by combining the mutagenesis of yeast IF1 and F_1-ATPase with kinetics of inhibition. First, we evaluated the role of some residues located in the C-terminal part of β subunit in the specific molecular recognition of IF1 by the mitochondrial ATPase. These residues belong to the region of the α/β interface that closes up on IF1 peptide. Then, we showed that the N-terminal part of IF1 plays a minor role in the molecular recognition but its winding around the γ subunit constitute an important lock in the inhibited complex. Finally, the closing of the catalytic interface on IF1 creates a contact region between the α and the γ subunit which is the last key that definitively locks the peptide in the cage "F_1-ATPase". This last locking point is the only one that does not involve any IF1 residue.

RÉSUMÉ

L'ATP synthase ou ATPase de type F, ancrée aux membranes internes des mitochondries, est un complexe macromoléculaire qui utilise le gradient électrochimique généré par l'oxydation de petites molécules ($NADH_2$, $FADH_2$) dans les différents complexes de la chaîne respiratoire pour former l'ATP, vecteur énergétique universel. Le gradient électrochimique ou *pmf* est transformé en une énergie mécanique qui se traduit par le mouvement du rotor de l'ATP synthase dans un sens horaire vu depuis la membrane. La rotation de la sous-unité γ déforme successivement les trois sites catalytiques et permet ainsi la synthèse d'ATP. Dans certains cas, comme ceux de l'anoxie ou de l'hypoxie, le gradient électrochimique peut s'effondrer et l'ATP synthase hydrolyse alors l'ATP. Pour éviter cette hydrolyse futile, un petit peptide nommé IF1, régulateur spécifique des ATP synthases mitochondriales, vient s'insérer entre les sous-unités d'une interface catalytique et bloque instantanément le fonctionnement de l'ATPase. Cette inhibition est réversible puisque le peptide se décroche lorsque la membrane interne mitochondriale se réenergise.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à caractériser le mécanisme d'inhibition de l'ATPase de *S.cerevisiae* par son peptide endogène IF1 en s'appuyant essentiellement sur les quelques données structurales qui ont été publiées sur le peptide et sur le complexe inhibé IF1-F_1-ATPase de *B.taurus*.

Constitué de 63 acides aminés chez *S.cerevisiae* et 84 acides aminés chez *B.taurus*, IF1 est majoritairement structuré en hélice α. Les études menées par Elena Cabezón ont montré qu'IF1 possédait différentes formes dont la prédominance et l'activité dépendait essentiellement du pH. Chez *B.taurus*, il existe une forme inhibitrice dimérique prédominante à pH inférieurs à 6,5 et une forme tétramérique dont nous connaissons la structure 3D qui est non inhibitrice et prépondérante à pH supérieurs à 6,5. Chez *S.cerevisiae*, il existe une forme monomérique inhibitrice prépondérante à pH supérieur à 6,5 et une forme dimérique prédominante à pH inférieurs à 6,5 et dont le caractère inhibiteur ou non n'a pas encore été déterminé. Sur la base de la structure 3D de l'IF1 bovin, nous avons voulu identifier les régions de dimérisation du peptide de levure en utilisant la technique de marquage de spin couplée à de la spectroscopie RPE. En plaçant des marqueurs de spin (MTSL) en partie médiane (E33C) ou en C-terminale (L54C), nous avons pu favoriser l'interface de dimérisation plutôt en partie médiane du peptide. Ce travail est encore au stade embryonnaire et ne nous permet pas, à ce jour, d'identifier la zone exacte de dimérisation.

Dans un deuxième volet, nous avons voulu caractériser le mécanisme d'inhibition d'un point de vue dynamique et nous avons pu en préciser les différentes étapes : reconnaissance, verrouillage et stabilisation. Pour cela, nous avons associé la mutagenèse sur le peptide et sur l'enzyme aux cinétiques d'inhibition. Nous avons tout d'abord évalué le rôle de plusieurs résidus situés en C-terminal de la sous-unité β, dans la région de l'interface α/β qui se referme sur le peptide IF1, dans la reconnaissance moléculaire spécifique d'IF1 par l'ATPase mitochondriale. Nous avons ensuite montré que la partie N-terminale d'IF1 joue un rôle mineur dans la reconnaissance moléculaire mais son enroulement autour de la sous-unité γ constitue un loquet important dans la stabilisation du complexe inhibé. Enfin, la fermeture de l'interface catalytique sur IF1 crée une zone de contact entre la "bosse" de la sous-unité γ et la partie C-terminale de la sous-unité α qui constitue la dernière clef de blocage du peptide au sein de la F_1-ATPase. Ce dernier point de fermeture est le seul qui n'implique aucun résidu du peptide IF1.