2m11. 2854.12

Université de Montréal

Développement d'un nouvel essai de complémentation protéique pour l'étude des interactions protéine-protéine. Le PCA de la bêta-lactamase.

Par
André Galarneau
Département de biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieurs
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc)
en biochimie

Janvier 2001

©André Galarneau, 2001

Faculté des Études Supérieures
Grade octroyé à compter du
MAI 9 2001
Université de Montréal

W
4
U58
2001
v.040

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Développement d'un nouvel essai de complémentation protéique

pour l'étude des interactions protéine-protéine.

Le PCA de la bêta-lactamase.

Présenté par

André Galarneau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Normand Brisson	président-rapporteur
Dr Stephen Michnick	directeur de recherche
Dr Jeffrey Keillor	membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

Les interactions protéine-protéine sont impliquées au niveau de la majorité des processus biologiques tels que la croissance cellulaire, la prolifération, la différentiation pour ne nommer que ceux-ci. C'est au sein des voies biochimiques intracellulaires que les interactions protéine-protéine prennent tout leur sens car l'ensemble des processus biologiques et cellulaires sont contrôlés par celles-ci. Chez les cellules mammifères, les interactions protéine-protéine constituent les évènements clés qui modulent l'activité des voies biochimiques menant habituellement à l'activation de gènes spécifiques et à une réponse appropriée. Il existe plusieurs techniques permettant d'étudier les interactions protéine-protéine notamment celle du double hybride, de la co-immunoprécipitation et du FRET ou BRET.

C'est dans le but d'étudier ces voies biochimiques que notre équipe a mis au point une technique permettant l'étude des interactions protéine-protéine. Le « protein fragment complementation assay » ou PCA est une méthode permettant d'étudier les interactions protéine-protéine avec une grande spécificité chez les cellules procaryotes ou eucaryotes. Les travaux présentés dans ce mémoire rapportent le développement rationnel d'un nouveau PCA permettant l'étude des interactions protéine-protéine en cellules vivantes sans la présence de bruit de fond endogène. Ce nouvel essai est basé sur le réassemblement et le repliement assisté de deux fragments inactifs de la β-lactamase TEM-1 (E.C.3.5.2.6) via l'intervention de protéines interagissantes. L'activité enzymatique de la protéine rapporteuse (β-lactamase) permet l'accumulation de produit suite à l'hydrolyse d'un substrat créant ainsi une amplification de signal. Grâce à deux systèmes de dimérisation protéique, nous avons pu démontrer qu'il est possible d'étudier des interactions protéine-protéine de manière *in vitro* et *in vivo* à l'aide du PCA de la β-lactamase. Nous avons ainsi démontré que la complémentation des fragments de la β-lactamase est possible grâce à l'interaction spontanée des zippers de leucine GCN4. Mais aussi grâce à l'induction de la dimérisation de FKBP et le domaine FRB de FRAP en réponse à des doses croissantes de rapamycine. De plus, il y a absence de réassemblement spontané des fragments de la β-

lactamase. Nous avons aussi déterminé le comportement de chacun des fragments selon leur orientation en rapport avec la fusion protéique et établi que la complémentation n'a pas lieu lorsque le fragment [2] est en position N-terminale mais qu'elle est possible dans tous les autres cas.

Mots clés : Complémentation, interactions protéiques, β-lactamase, PCA, design protéique

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE ..... **III**

TABLE DES MATIÈRES ..... **V**

LISTE DES TABLEAUX ..... **VIII**

LISTE DES FIGURES ..... **IX**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ..... **XI**

REMERCIEMENTS ..... **XIII**

DÉDICACE ..... **XIV**

CHAPITRE 1 -- INTRODUCTION -- **2**

1.1. INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE 2

1.1.1. Les voies de signalisation *2*

1.1.2. L'Ère post-génomique *3*

1.2. FACTEURS INFLUENÇANT L'ASSOCIATION PROTÉIQUE 5

1.3. MÉTHODES D'ÉTUDES DES INTERACTIONS PROTÉIQUES 6

1.3.1. Le système du double-hybride chez la levure *6*

1.3.2. FRET--- Fluorescence Resonance Energie Transfer *9*

1.3.3. BRET---Bioluminescence Resonance Energy Transfer *10*

1.3.4. Co-Immunoprécipitation *12*

1.3.5. Système Split Ubiquitin *12*

1.3.6. Autres méthodes *13*

1.4. PCA -- PROTEIN-FRAGMENT COMPLEMENTATION ASSAY 13

1.4.1. Principe et Design protéique *14*

1.4.2. Le PCA de la DiHydroFolate Réductase--PCA DHFR *17*

1.4.3. Autres PCA *18*

1.4.4. PCA versus autres méthodes *19*

1.5. UN NOUVEAU PCA — LE PCA DE LA β-LACTAMASE 19

1.5.1. Famille des Bêta(β)-lactamases *21*

1.5.2. Structure générale de la β-lactamase *23*

1.5.2.1. Structure et design du site actif 25

1.5.3. Analyse mécanistique et structure de l'intermédiaire acyl-enzyme *27*
1.5.4. Mutagénèse de la β-lactamase *32*
1.5.5. Substrats *34*
1.5.5.1. Nitrocéfine 34
1.5.5.2. CCF2-AM 36
1.6. DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE 38

CHAPITRE 2 -- MATÉRIELS ET MÉTHODES -- **40**

2.1. MATÉRIELS 40
2.1.1. Construction d'ADN *40*
2.1.2. Culture cellulaire et transfection *40*
2.1.3. Essai colorimétrique in vitro *41*
2.1.4. Essai fluorométrique et microscopie in vivo *41*
2.2. MÉTHODES 42
2.2.1. Construction d'ADN *42*
2.2.1.1. Permutation circulaire, insertion de 15 acides aminés, et clonage de l'enzyme β-lactamaseΔ 42
2.2.1.2. Construction du système de zippers de leucine GCN4 43
2.2.1.3. Construction du système de dimérisation de Bcl-2 43
2.2.1.4. Construction du système FKBP/domaine FRB (TOR) 44
2.2.2. Culture cellulaire et transfection *45*
2.2.3. Essai colorimétrique in vitro *45*
2.2.4. Essai fluorométrique in vivo *46*
2.2.4.1. Activité enzymatique 46
2.2.4.2. Microscopie de fluorescence 47

CHAPITRE 3 -- RÉSULTATS -- **49**

3.1. DESIGN DU PCA DE LA BÉTA-LACTAMASE 49
3.2. BRUIT DE FOND ENDOGÈNE 53
3.3. INSERTION QUINTAPEPTIDIQUE ET PERMUTATION CIRCULAIRE AU NIVEAU DE LA BOUCLE ϕ 53
3.4. SYSTÈME DE DIMÉRISATION DES ZIPPERS DE LEUCINE GCN4 56
3.4.1. Analyse in vitro *56*
3.4.2. Analyse in vivo *59*
3.5. SYSTÈME DE DIMÉRISATION DE FKBP ET DU DOMAINE FRB 62

CHAPITRE 4 – DISCUSSION – **66**

4.1. UN NOUVEL ESSAI DE COMPLÉMENTATION PROTÉIQUE 66
4.1.1. Bruit de fond *66*
4.1.2. Choix du site de coupure *66*
4.1.3. Complémentation des fragments de la β-lactamase *69*
4.2. CONCLUSIONS 71
4.3. PERSPECTIVES 74
RÉFÉRENCES 75

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I RÉSUMÉ DES PRINCIPAUX AVANTAGES ET DÉSAVANTAGES OBSERVÉS CHEZ LES DIVERSES MÉTHODES D'ÉTUDE D'INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE. 20

TABLEAU II RÉSUMÉ DE LA MUTAGENÈSE 33

TABLEAU III RÉSUMÉ DES PRINCIPAUX AVANTAGES ET DÉSAVANTAGES OBSERVÉS CHEZ LES DIVERSES MÉTHODES D'ÉTUDE D'INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE INCLUANT LE PCA β-LACTAMASE. 73

LISTE DES FIGURES

FIGURE #1 EXEMPLES DE VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE.....4

FIGURE #2 PRINCIPE DE BASE DU SYSTÈME DOUBLE-HYBRIDE CHEZ LA LEVURE. 8

FIGURE #3 PRINCIPE DE BASE DES SYSTÈMES UTILISANT LE FRET ET BRET.....11

FIGURE #4 PRINCIPE DE BASE DU PROTEIN-FRAGMENT COMPLEMENTATION ASSAY (PCA). 16

FIGURE #5 SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE (5'-3') ET PROTÉIQUE DE L'ISOFORME TEM-1 DE LA β-LACTAMASE.....24

FIGURE #6 STRUCTURE GÉNÉRALE DE LA β-LACTAMASE TEM-1 À UNE RÉSOLUTION DE 1,8 Å. 26

FIGURE #7 SCHÉMA DU MÉCANISME D'HYDROLYSE IMPLIQUANT UN INTERMÉDIAIRE ACYL-ENZYME. 27

FIGURE #8 STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU SITE ACTIF DE LA β-LACTAMASE TEM-1 À UNE RÉSOLUTION DE 1,8 Å. 28

FIGURE #9 MÉCANISME CATALYTIQUE DES β-LACTAMASES POSSÉDANT UN SITE ACTIF À SÉRINE 30

FIGURE #10 REPRÉSENTATION STRUCTURALE DE L'INTERMÉDIAIRE ACYL-ENZYME DE LA β-LACTAMASE TEM-1 À UNE RÉSOLUTION DE 1.7Å. 31

FIGURE #11 : STRUCTURE CHIMIQUE DES PRINCIPAUX SUBSTRATS ET INHIBITEURS. 35

FIGURE #12 REPRÉSENTATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES SUBSTRATS UTILISÉS DANS LA MISE AU POINT DU PCA DE LA β-LACTAMASE. 37

FIGURE #13 ÉTUDE DE LA LOCALISATION DU SITE DE COUPE SUR LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA β-LACTAMASE TEM-1 À UNE RÉSOLUTION DE 1,8 A 50

FIGURE #14 PRÉSENTATION DU SITE DE COUPE AVEC LA SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE (5'-3') ET PROTÉIQUE DE L'ISOFORME TEM-1 DE LA β-LACTAMASE. 52

FIGURE #15 EFFET DE LA PERMUTATION DE L'ENZYME ET DE L'INSERTION PENTAPEPTIDIQUE SUR LE TAUX D'HYDROLYSE DE LA NITROCÉFINE PAR LA B-LACTAMASEΔ EN COMPARAISON AVEC LE BRUIT DE FOND ENDOGÈNE. 54

FIGURE #16 ÉTUDE *IN VITRO* DE LA COMPLÉMENTATION DES FRAGMENTS DE LA B-LACTAMASE PAR LE SYSTÈME DE DIMÉRISATION HOMODIMÈRIQUE DES ZIPPERS DE LEUCINE GCN4 57

FIGURE #17 ÉTUDE *IN VIVO* DE LA COMPLÉMENTATION DES FRAGMENTS DE LA B-LACTAMASE PAR LE SYSTÈME DE DIMÉRISATION HOMODIMÈRIQUE DES ZIPPERS DE LEUCINE GCN4 60

FIGURE #18 MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE DU SYSTÈME DE DIMÉRISATION HOMODIMÉRIQUE DES ZIPPERS DE LEUCINE GCN4 61

FIGURE #19 ÉTUDE *IN VITRO* DE LA COMPLÉMENTATION DES FRAGMENTS DE LA B-LACTAMASE PAR LE SYSTÈME INDUCTIBLE DE DIMÉRISATION HÉTÉRODIMÉRIQUE DE FKBP ET DU DOMAINE FRB 64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

β-lactamaseΔ	β-lactamase amputée de son peptide signal de sécrétion
10 a.a. ou 15 a.a.	Espaceur de 10 ou 15 acides aminés
ABL	β-Lactamase de classe A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messager
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
Bcl2Δ	Bcl-2 amputé de sa région d'encrage à la mitochondrie
BLF[1]	Fragment [1] de la β-lactamase
BLF[2]	Fragment [2] de la β-lactamase
BRET	*Bioluminescence resonance energy transfer*
CMI	Concentration minimale d'inhibition
DHFR[1,2]	Fragment [1,2] de la DHFR
DHFR[3]	Fragment [3] de la DHFR
DMSO	Diméthylsulfoxide
E. coli	*Escherichia coli*
EBFP	*Enhanced blue fluorescent protein*
EYFP	*Enhanced yellow fluorescent protein*
FGF	*Fibroblast growth factor*
FKBP	*FK506 binding protein*
FRAP	*FKBP12-rapamycine-associating protein*
FRB	*FKBP-rapamycine-binding domain of FRAP*
FRET	*Fluorescence resonance energy transfer*
GAR	Glycinamide ribonucléotide
GFP	*Green fluorescent protein*
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
Ha tag	Epitope hemaglutinine

His_6	Epitope hexa-histidine
Hygro	Hygromycine
Leu	Leucine
Lys	Lysine
mDHFR	*murine Dihydrofolate reductase*
Néo	Néomycine
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCA	*Protein fragment complementation assay*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDB	*Protein data bank*
Sér	Sérine
Thr	Thréonine
TNF	*Tumor necrosis factor*
TOR	*Target of rapamycin*
ZipGCN4	Zipper de leucine GCN4

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Stephen Michnick pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je désire souligner l'implication exemplaire du Dr Michnick pour le développement académique de mes études graduées. Il a toujours été disponible pour mes questions et pour bien plus encore. Il est et restera le premier chercheur pour qui j'aurai travailler et j'en serai toujours très fier.

Je désire remercier le Dr Louis-Éric Trudeau du département de pharmacologie pour avoir accepté de participer à cette étude par l'utilisation de son équipement d'imagerie et lors de discussions très intéressantes concernant le projet de recherche sur lequel j'ai travaillé.

Je tiens à remercier le Dr Jeffrey Keillor du département de chimie pour m'avoir laissé utiliser le lecteur de plaque à 96 puits qui fut toujours disponible peu importe la journée ou l'heure à laquelle je travaillais.

Je désire aussi remercier tous les membres du laboratoire pour leur support scientifique et moral. Je ne saurais passer sous silence l'expérience et l'appui important de François-Xavier Campbell Valois, d'Alexis Vallée-Bélisle et de Galia Ghaddar lors de discussions plus captivantes les unes que les autres. Je tiens également à remercier Martin Primeau pour son aide apportée à la biologie moléculaire, Louise Cournoyer et Mireille Fyfe pour l'aide apportée à la biologie cellulaire.

Merci à François-Xavier et Mélanie St-Pierre pour leur lecture assidue et minutieuse de ce manuscrit.

Finalement je remercie le Dr Normand Brisson et le Dr Jeffrey Keillor pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à ma famille,
mon père Gaétan, ma mère Lise,
mon frère David et maintenant Mélanie,
dont le support moral fut constant
pendant toute la période de mes études.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

CHAPITRE 1 -- INTRODUCTION --

1.1.INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE

Les interactions protéine-protéine jouent un rôle dans la majorité des processus biologiques. Ceux-ci peuvent être fondamentaux tels que la dimérisation de récepteurs (Pitcher *et al.*, 1998), les interactions protéiques conduisant à la stimulation ou l'inhibition de la transmission de signaux (Hunter, 2000), la transcription (Myers *et al.*, 2000), la traduction (Gingras *et al.*, 1999), la réplication (Waga *et al.*, 1998), la mort et la survie cellulaire (Strasser *et al.*, 2000) ainsi que la différenciation cellulaire (Grandori *et al.*, 2000) pour ne nommer que ceux-là. Ces processus peuvent aussi être très spécialisés, tel la motilité chimiotactique, la sécrétion ou l'activité électrique. Tous ces exemples de processus ou de réponses cellulaires sont d'une importance biologique et pharmacologique fondamentale car les interactions protéine-protéine qu'ils impliquent sont des cibles potentielles d'action pour le développement d'agents pharmacologiques. La maîtrise de ces évènements biologiques implique nécessairement la compréhension des interactions protéine-protéine engagées aux niveaux de ces phénoménes.

1.1.1. Les voies de signalisation

C'est vraiment au niveau des voies biochimiques intracellulaires que les interactions protéine-protéine prennent ainsi toutes leurs significations car l'ensemble des processus biologiques et cellulaires sont régulés par ces dernières (Klemm *et al.*, 1998). Chez les cellules de mammifères, les interactions protéine-protéine constituent les étapes clées qui modulent l'activité des voies biochimiques menant communément à l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques. La résolution des voies de liaisons protéiques a beaucoup aidé à déterminer la transmission des signaux intracellulaires et les voies métaboliques qui conduisent à un phénotype particulier. De plus, la détermination de la

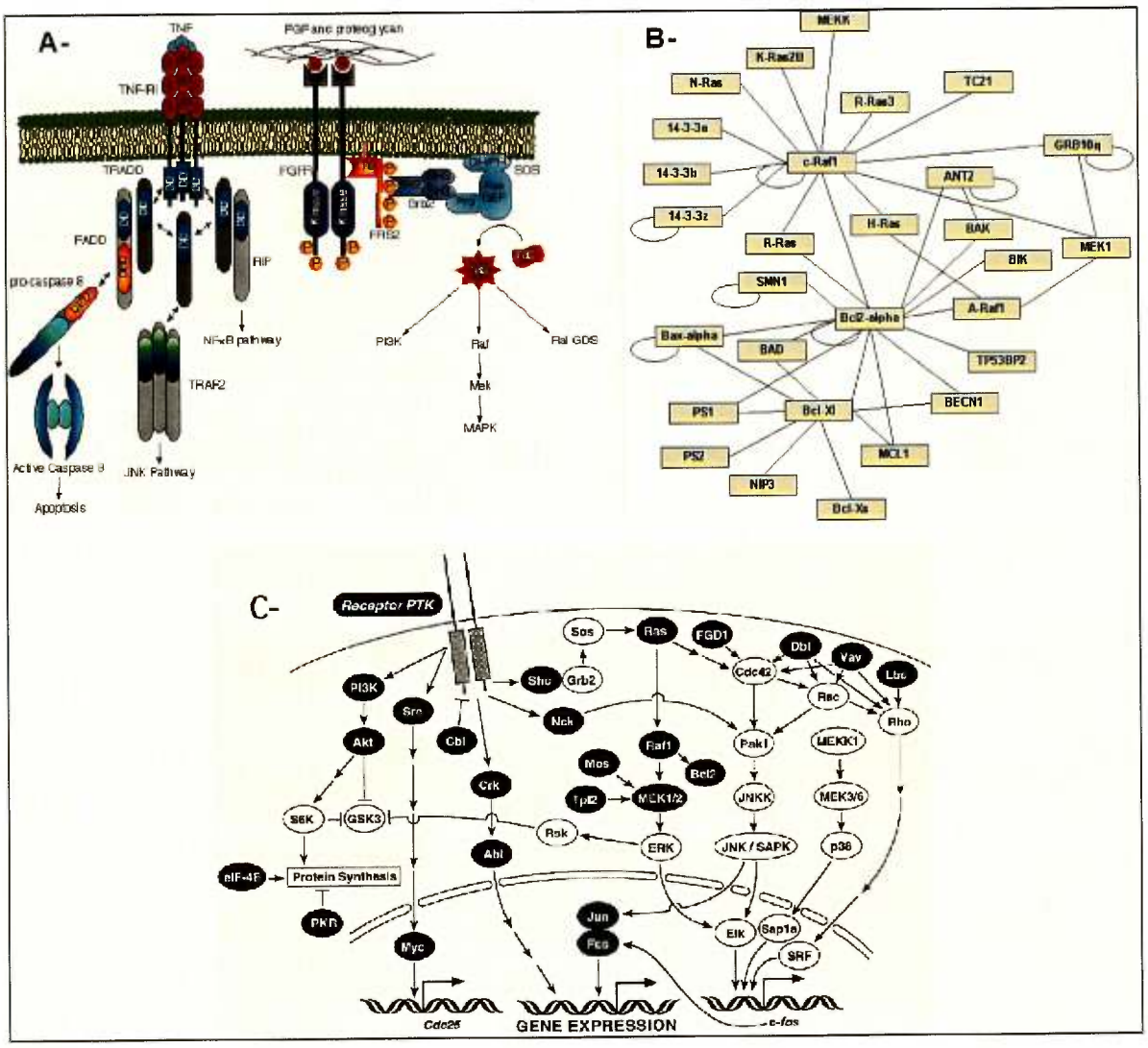
fonction d'une nouvelle protéine se fait, dans un premier temps, en identifiant avec quelles autres protéines cette dernière peut interagir. En faisant cela, il est aussi possible d'identifier le rôle que cette nouvelle protéine joue dans une voie biochimique pour ensuite vérifier si sa présence est d'une quelconque influence sur le phénotype normalement observé par l'activation de cette voie. Les voies biochimiques impliquent donc la coopération d'un réseau de milliers de protéines qui reçoivent un grand nombre de stimuli extérieurs. Ces stimuli sont intégrés, amplifiés et conduisent à une réponse appropriée. La régulation de l'activité de chacune de ces protéines fait partie d'un équilibre délicat que la cellule se doit de respecter. Dans le cas contraire, plusieurs maladies, notamment le cancer et les maladies dégénératives, peuvent survenir (Hunter, 2000). De plus, de nouvelles voies et de nouvelles protéines sont découvertes régulièrement amenant une complexité considérable dans la représentation des cartes d'interactions (voir figure #1).

1.1.2. L'Ère post-génomique

Les récentes découvertes au niveau de la recherche génomique ont conduit à des progrès rapides et à l'identification de nombreux nouveaux gènes. L'aboutissement du séquençage complet des génomes de plusieurs organismes expérimentaux, notamment ceux de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996), de *Caenorhabditis elegans* (The *Caenorhabditis elegans* Sequence Consortium, 1998) et de *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), a conduit à l'identification de tous ces nouveaux gènes. Bientôt, avec les nouvelles techniques de séquençage automatique ainsi que les nouvelles biotechnologies, plusieurs autres génomes eucaryotes, en comptant celui de l'humain, seront séquencés en totalité. Rapidement, nous devrons, à des fins biologiques et pharmacologiques, déterminer les fonctions des nouveaux produits de ces gènes. Une étape importante de la résolution de la fonction protéique est l'étude des interactions rencontrées entre ces protéines, et cela, dans un environnement donné et selon des stimuli particuliers impliqués.

Figure #1 Exemples de voies de signalisation cellulaire.

A- Illustration des divers domaines et protéines impliquées chez les voies de signalisation du Tumor Necrosis Factor (TNF) et du Fibroblast Growth Factor (FGF) (tirée de Pawson *et al.*, 2000). **B-** Cartes graphiques illustrant les diverses interactions protéine-protéine impliquées avec c-Raf1, Bcl2-alpha et Bcl-Xl. Il est à noter que les interactions illustrées en B- proviennent du site internet pronet.doubletwist.com. Les gestionnaires de ce site mentionnent que certaines interactions ne sont pas encore répertoriées. **C-** Principales voies de signalisation impliquées dans la maladie cancéreuse (tirée de Hunter, 1997). Remarquer la complexité et le nombre de protéines impliquées.


A-
TNF
TNF-RI
FGF and proteoglycan
TRADD
FGFR
SOS
Grb2
FRS2
FADD
RIP
pro-caspase 8
NFκB pathway
PI3K
Raf
Ral GDS
Mek
MAPK
TRAF2
Active Caspase 8
JNK Pathway
Apoptosis
B-
MEKK
K-Ras2B
N-Ras
R-Ras3
TC21
14-3-3e
c-Raf1
GRB10α
14-3-3b
ANT2
14-3-3z
H-Ras
BAK
R-Ras
MEK1
BIK
SMN1
A-Raf1
Bcl2-alpha
Bax-alpha
BAD
TP53BP2
PS1
Bcl-Xl
BECN1
PS2
MCL1
NIP3
Bcl-Xs
C-
Receptor PTK
Sos
Ras
FGD1
Dbl
Vav
Lbc
Cdc42
Rac
Rho
Shc
Grb2
PI3K
Nck
Pak1
MEKK1
Src
Cbl
Akt
Raf1
Bcl2
Mos
Csk
Tpl2
MEK1/2
JNKK
MEK3/6
S6K
GSK3
Rsk
ERK
JNK / SAPK
p38
Abl
eIF-4F
Protein Synthesis
PKR
Jun
Fos
Elk
Sap1a
SRF
Myc
Cdc25
GENE EXPRESSION
c-fos

La détermination des fonctions protéiques à grande échelle ouvre maintenant la voie à une nouvelle génération d'études que certains se plaisent à appeler la protéonomique ou encore l'ère post-génomique. C'est pourquoi le développement de nouvelles technologies pour l'étude des fonctions protéiques est extrêmement important pour l'exploration des fonctions de ces nouveaux produits de gène ainsi que l'élucidation complète des voies biochimiques intracellulaires.

1.2. FACTEURS INFLUENÇANT L'ASSOCIATION PROTÉIQUE

L'évènement d'association protéique peut se définir très simplement comme étant l'interaction physique entre deux ou plusieurs protéines. Cette dimérisation ou multimérisation protéique permet la régulation de phénomènes cellulaires via les voies de signalisation (Klemm *et al.*, 1998). La plupart des informations obtenues concernant ces voies proviennent d'expériences en biochimie. L'activité enzymatique, l'étude des protéines comme substrat ou comme inhibiteur, la phosphorylation, la méthylation sont des exemples d'études nous permettant de créer une représentation graphique abstraite de ces voies biochimiques. Mais ces études ne restent que très sommaires si l'on ne considère pas ce qui se passe vraiment dans la cellule. Il faut aussi analyser la localisation spatiale des molécules impliquées, leur vitesse de diffusion, leur orientation et plusieurs autres paramètres biophysiques importants (Bray, 1998). Au niveau cellulaire, les réactions ne se réalisent pas comme dans une solution diluée où normalement nous testons les enzymes, mais plutôt dans une soupe beaucoup plus concentrée de protéines. Étant donné la forte concentration protéique présente au niveau intra-cellulaire, quels sont les facteurs qui permettent à une protéine d'interagir avec une autre? Pourquoi une protéine interagit-elle avec celle-ci et non avec celle-là?

Jones et Thornton ont suggéré qu'il existe deux types d'interaction répertoriés dans les fichiers du Brookhaven Protein Data Bank : les interactions formant des homocomplexes et les interactions formant des hétérocomplexes. Cette dernière catégorie peut-être divisée en deux sous catégories : les hétérodimères et les interactions entre les enzymes et leurs inhibiteurs (Jones *et al.*, 1996). Leurs travaux consistaient à caractériser les interfaces

protéine-protéine des divers complexes répertoriés dans cette banque de donnée et à identifier les facteurs biophysiques qui favorisent les interactions protéine-protéine. Elles ont pu déterminer plusieurs facteurs physiques propres aux protéines, pouvant ainsi influencer la formation de complexes à l'intérieur d'une cellule. Elles identifièrent les facteurs suivant pour les interfaces de dimérisation protéique: 1) la grosseur et la forme; 2) la complémentarité électrostatique des surfaces inter-agissantes; 3) la distribution des acides aminés, c'est-à-dire les probabilités de retrouver un résidu plutôt qu'un autre à cet endroit précis de l'interaction; 4) l'hydrophobicité des acides aminés ainsi que les ponts hydrogènes présents entre ces chaînes latérales impliquées; 5) la segmentation protéique impliquée au niveau de ces interactions; 6) les structures secondaires rencontrées. En résumé, ce sont tous ces facteurs biophysiques qui déterminent si une interaction entre deux ou plusieurs interfaces protéiques est possible au niveau intra-cellulaire. Leurs conclusions proviennent surtout de données statistiques mais elles illustrent bien que plusieurs phénomènes régissent les interactions protéine-protéine. Cela rend l'étude de celles-ci beaucoup plus complexe que l'on peut l'imaginer.

1.3.MÉTHODES D'ÉTUDES DES INTERACTIONS PROTÉIQUES

Devant les complications rencontrées lors de l'étude des interactions protéine-protéine, les chercheurs ont toujours essayé de trouver de nouvelles méthodes afin d'analyser les complexes protéiques ainsi que les voies biochimiques intracellulaires. C'est pourquoi l'on retrouve plusieurs techniques permettant l'étude des interactions protéine-protéine *in vivo*. Certaines de ces méthodes sont très utilisées incluant le système du double-hybride ainsi que la co-immunoprécipitation. D'autres sont en plein développement comme c'est le cas pour le FRET, le BRET et le PCA.

1.3.1. Le système du double-hybride chez la levure

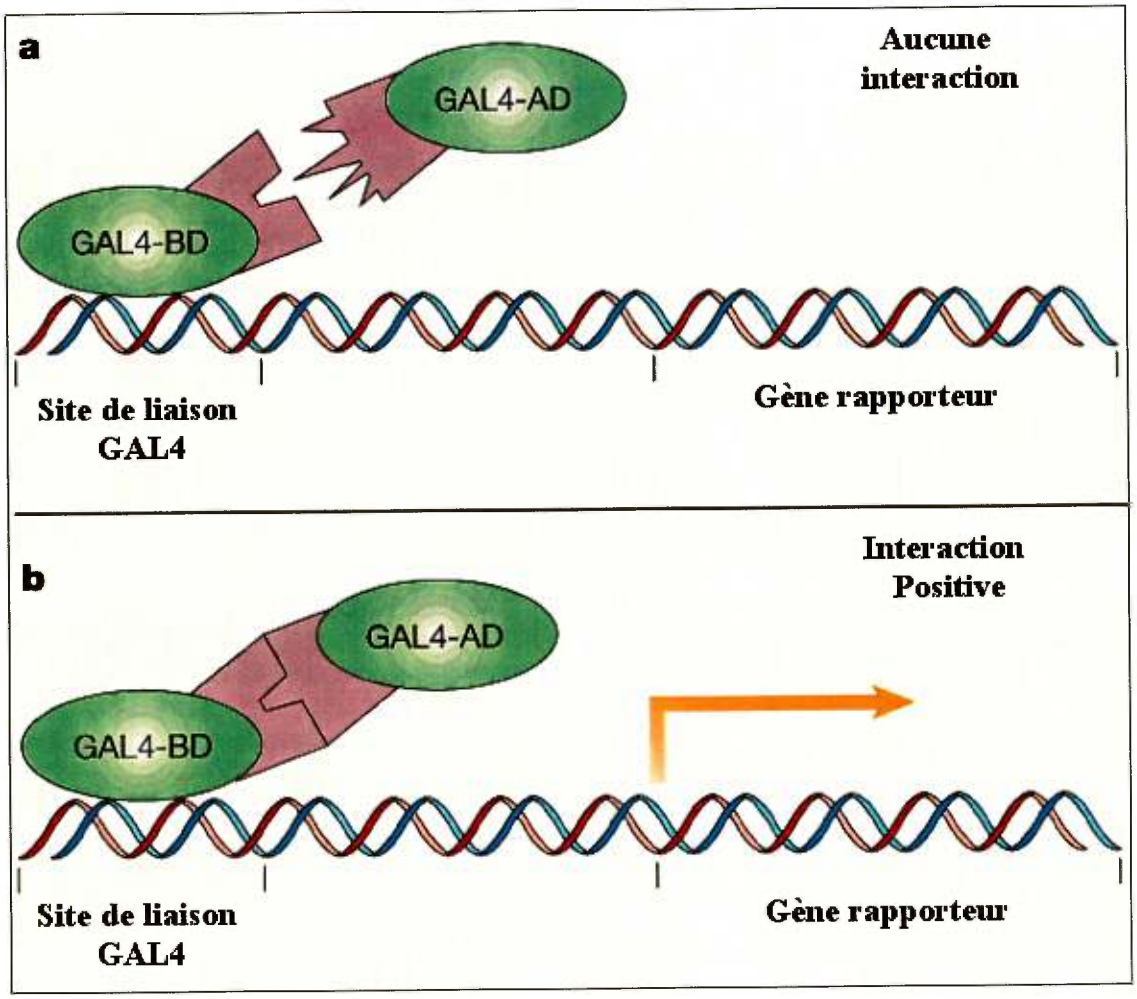
Depuis sa sortie vers la fin des années 1980, le système du double-hybride a beaucoup évolué et est maintenant une technique très bien établie (Fields *et al.*, 1989 ;

Vidal *et al.*, 1999 ; Legrain *et al.*, 2000). Le concept de base du système double-hybride est très simple, il consiste à dépister une interaction entre deux protéines via une activation transcriptionnelle de un ou plusieurs gènes rapporteurs. Un activateur de transcription eucaryotique possède normalement un domaine qui lie spécifiquement des séquences d'ADN (domaine de liaison à l'ADN ou BD pour " binding domain ") et un domaine qui recrute la machinerie transcriptionnelle (domaine d'activation ou AD pour " activation domain "). Chez le système du double-hybride, représenté à la figure #2, ces deux domaines sont séparés donc totalement distincts. Ces derniers sont liés directement aux protéines ou polypeptides d'intérêts (en rose sur la figure #2). Le principe de ce système repose sur le fait que la transcription du gène rapporteur aura lieu seulement si les polypeptides interagissent ensembles recréant ainsi l'effet de l'activateur transcriptionnel (figure #2B). Étant donné qu'il s'agit d'une activation transcriptionelle, l'interaction est étudiée dans le noyau de la levure *Saccharomyces cerevisae.*

Les combinaisons de domaines d'activation et de liaison ainsi que les gènes rapporteurs (GFP, chloramphénicol acétyl transférase, luciférase) sont optimisés au maximum afin d'obtenir le moins de faux positifs et de faux négatifs (Legrain *et al.*, 2000). Un faux positif est observé lorsqu'il y a activation transcriptionnelle sans nécessairement qu'il y ait une interaction physique entre les protéines ou encore lorsque des protéines interagissent ensembles mais que cette interaction n'est pas biologiquement révélatrice. Un faux négatif est retrouvé lorsque deux protéines, dont on connait une interaction physique, n'active pas le gène rapporteur via la technique de double-hybride. L'essai du double-hybride est grandement utilisé pour le criblage de librairies d'ADNc dans le but d'identifier de nouvelles interactions (Legrain *et al.*, 2000). Les principaux avantages de cette méthode sont qu'elle est bien établie et standardisée en plus d'être abondamment utilisée pour la découverte de nouvelles interactions à grande échelle. Les désavantages de cette méthode sont 1) elle requiert la localisation des protéines hybrides au niveau nucléaire de *Saccharomyces cerevisae* d'où l'impossibilité d'étudier des interactions membranaires ou encore d'étudier ces interactions dans leur environnement naturel; 2) étant donné qu'il s'agit de la lecture d'un gène rapporteur (méthode indirecte), il est tout simplement impossible de mesurer la cinétique des complexes protéiques étudiés.

Figure #2 Principe de base du système double-hybride chez la levure.

A- Aucune interaction possible entre les deux protéines (en rose). Les interfaces de dimérisation ne sont pas compatibles en conséquence absence d'activation transcriptionnelle du gène rapporteur. **B-** Les interfaces sont capables d'interagir permettant ainsi au domaine d'activation d'augmenter le niveau de transcription du gène rapporteur.


a
Aucune interaction
GAL4-AD
GAL4-BD
Site de liaison GAL4
Gène rapporteur
b
Interaction Positive
GAL4-AD
GAL4-BD
Site de liaison GAL4
Gène rapporteur

1.3.2. FRET--- Fluorescence Resonance Energy Transfer

Étant donné les limitations imposées par l'orientation et la distance, cette technique a surtout été utilisée pour l'étude des changements conformationnels protéiques. Par exemple, Tsien *et al.* ont démontré, grâce à leurs caméléons protéiques, les changements de conformation observés chez la calmoduline lorsque celle-ci est liée ou non par le calcium (Tsien *et al.*, 1998). De plus, Suzuki *et al.* furent en mesure de répéter une étude semblable mais cette fois avec la myosine lorsqu'elle est liée ou non par l'ATP (Suzuki *et al.*, 1998). Récemment, Mahajan *et al.* ont observé, via la méthode utilisant le FRET, une interaction protéine-protéine entre Bcl-2 et Bax, deux protéines impliquées au niveau des voies cellulaires apoptotiques (Mahajan *et al.*, 1998).

Cette technique fait appel à un transfert d'énergie de fluorescence par la résonance (FRET) (Selvin, 2000). Ce phénomène permet le transfert d'énergie provenant d'un fluorophore donneur à un fluorophore accepteur. D'un point de vue moléculaire, le fluorophore donneur est d'abord excité par la lumière et si l'accepteur est situé à proximité (moins de 100 Å), l'énergie d'émission du donneur peut être transféré à l'accepteur. Ceci permet la réduction de l'émission de fluorescence du donneur et augmente celle de l'accepteur. Dernièrement, plusieurs études de mutagenèse ont permis d'améliorer considérablement les protéines fluorescentes (Tsien, 1998; Matz *et al.*, 1999; Wildt *et al.*, 1999) permettant ainsi un meilleur transfert d'énergie. Il est important de mentionner que le transfert d'énergie dépend directement de la distance et de l'orientation moyenne retrouvée entre les deux fluorophores. En fusionnant les polypeptides d'intérêts aux protéines fluorescentes (fluorophores), il est possible, si les contraintes structurales le permettent, d'étudier directement la dimérisation des deux protéines (figure #3A et #3B). Le pouvoir de localiser l'interaction directement au niveau cellulaire procaryotique ou mammifère ainsi que la capacité de mesurer directement l'interaction sans la présence d'un intermédiaire sont les principaux avantages de ce système. La limite de cette technique est les contraintes structurales imposées par le système. En effet, la distance et l'orientation entre les fluorophores donneur et accepteur doivent être favorables au transfert d'énergie.

Si les deux protéines interagissent de manière à ce que le donneur soit dans une position défavorisant le transfert de son énergie à l'accepteur, il sera impossible d'étudier cette interaction. C'est pourquoi une absence de signal dans un système utilisant le FRET ne signifie pas nécessairement que les protéines sont incapables d'interagir entre elles. Un autre inconvénient provient du fait que les cellules doivent être excitées par une lumière de longueur d'onde tout près de l'ultraviolet. Ces longueurs d'onde peuvent être dommageables pour les cellules ou les tissus étudiés.

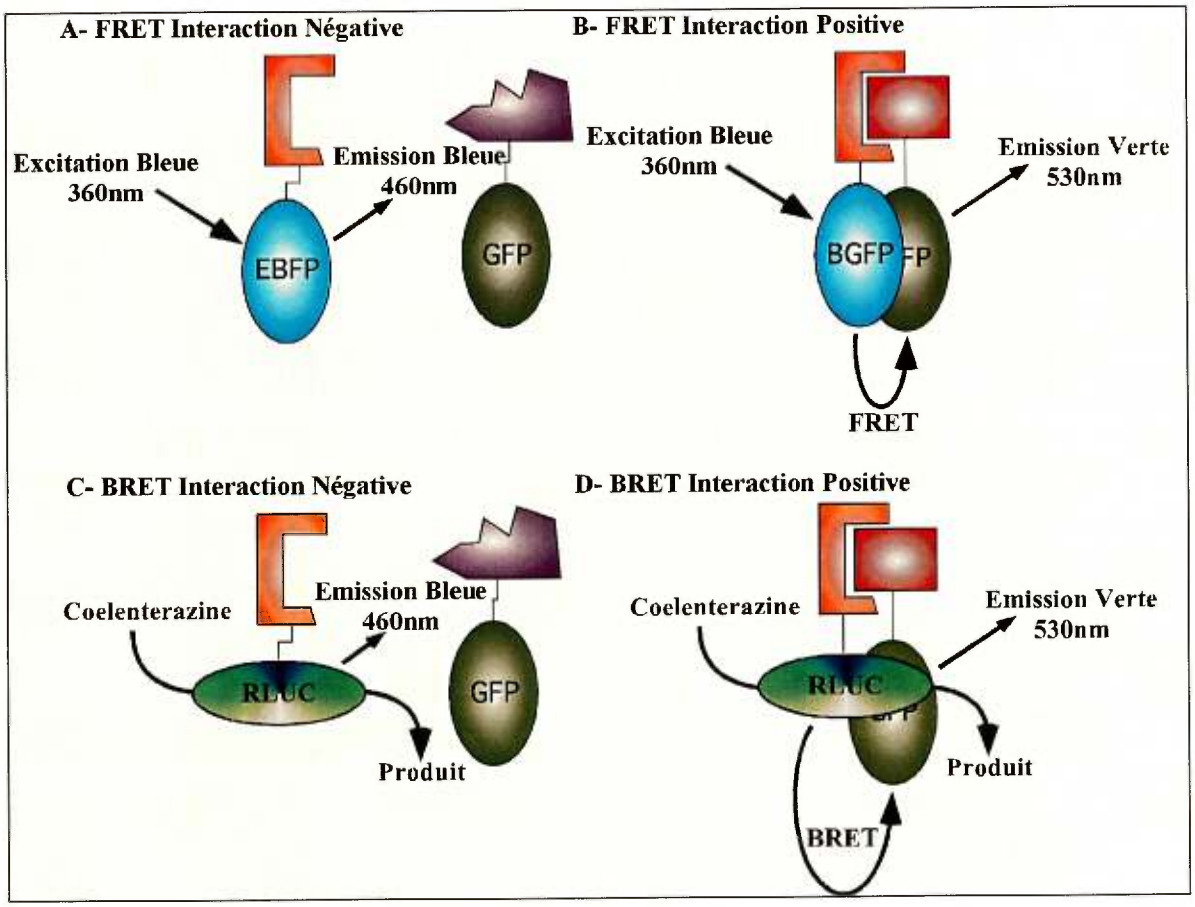
1.3.3. BRET---Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Le BRET garde sensiblement le même principe de fonctionnement que son homologue de transfert d'énergie discuté à la section précédente – le FRET (section 1.3.2.). Les fondements de cette technique sont les mêmes, par contre au lieu de stimuler une protéine fluorescente avec une lumière excitatrice près de l'ultraviolet, le BRET tire son application de la bioluminescence de la luciférase (Xu *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1998). Comme le représente la figure #3C et #3D, la EBFP a été remplacée par une luciférase recombinante capable d'émettre une lumière bleue d'une longueur d'onde de 480 nm lorsqu'elle transforme la coelentérazine (substrat) en son produit. L'énergie de cette lumière peut être transférée à une GFP modifiée (EYFP pour Enhanced Yellow Fluorescente Protéine; Tsien, 1998) qui pourra à son tour émettre une lumière fluorescente à environ 530 nm. La technique du BRET possède manifestement les mêmes avantages et inconvénients que ceux de son cousin le FRET. Par contre, étant donné que la luciférase utilise un substrat perméable au cellule pour produire sa lumière, on élimine ainsi la lumière U.V., rendant cette technique beaucoup moins dommageable pour les cellules.

Il est important de souligner encore une fois que lorsque l'on utilise les techniques du FRET ou du BRET, ce n'est pas parce qu'une interaction étudiée est négative que cette interaction n'est pas présente. Cette interaction peut exister mais elle reste impossible à étudier faute de l'orientation et/ou de la distance entre le donneur et l'accepteur.

Figure #3 Principe de base des systèmes utilisant le FRET et BRET.

A- En FRET, lorsque l'on excite la EBFP en absence d'interaction protéique, celle-ci ne peut transmettre sont énergie d'émission à la GFP et une fluorescence bleue à une longueur d'onde de 460 nm est alors notée. **B-** Par contre, lors d'une interaction positive, il y a transfert d'énergie de la EBFP à la GFP qui émet maintenant une fluorescence verte à 530 nm. **C-** En BRET, l'addition de coelenterazine permet à celle-ci d'émettre une fluorescence bleue à 460 nm en absence d'interaction protéique. **D-** En présence d'une association protéique, le transfert d'énergie est possible et l'on observera une fluorescence verte à 530 nm.


A- FRET Interaction Négative
Excitation Bleue
360nm
Emission Bleue
460nm
EBFP
GFP
B- FRET Interaction Positive
Excitation Bleue
360nm
Emission Verte
530nm
BGFP
FRET
C- BRET Interaction Négative
Coelenterazine
Emission Bleue
460nm
RLUC
GFP
Produit
D- BRET Interaction Positive
Coelenterazine
Emission Verte
530nm
RLUC
Produit
BRET

1.3.4. Co-Immunoprécipitation

Cette technique est sans doute la plus utilisée parmi toutes. Il s'agit d'une technique *in vitro* simple. Une fois les protéines exprimées dans les cellules eucaryotes ou procaryotes, les parois de ces dernières sont rompues par lyse ou sonication. Une des deux protéines étudiées est alors précipitée à l'aide d'un anticorps capable de reconnaître soit la protéine spécifiquement, soit un épitope spécifique (His_6 tag, Myc tag, Flag tag, Ha tag) placé en amont ou en aval de cette protéine. Ensuite on fait un immunobuvardage (western blot) contre la seconde protéine à l'aide encore une fois, d'un anticorps capable de reconnaître cette dernière ou un épitope spécifique en amont ou en aval de cette dernière. Si la seconde protéine est présente, on peut conclure en une interaction physique entre le duo protéique étudié. D'un point de vue biologique, cette méthode d'étude montre quelques inconvénients. D'abord, les interactions protéiques sont observées *in vitro* ce qui ne reflète pas du tout l'environnement normalement retrouvé au niveau cellulaire. De plus, les anticorps utilisés doivent être très efficaces afin de permettre l'immunoprécipitation, mais aussi afin de pouvoir observer la seconde protéine par immunobuvardage. La formation de réseaux entre les anticorps et les protéines immunoprécipitées peut aussi constituer des aggrégats artéfactuels. Lors de l'utilisation d'épitopes, parfois ceux-ci sont reconnus de manières différentes qu'ils soient en position N-terminal (en amont) ou C-terminal (en aval) des protéines étudiées donnant des résultats différents. En conclusion, l'immunoprécipitation est une bonne technique pour savoir si une interaction physique peut avoir lieu mais elle ne reflète pas du tout ce qui se passe normalement au niveau cellulaire.

1.3.5. Système Split Ubiquitin

Ce système repose sur le réassemblement assisté de deux fragments de la protéine ubiquitine (Johnsson *et al.*, 1994). De plus, une protéine rapporteuse (DHFR), à laquelle un épitope Ha (hémaglutinine) a été fusionné, est associée à l'extrémité C-terminal du fragment C-terminal de l'ubiquitine. Étant donné que le fragment N-terminal de

l'ubiquitine a été muté, le réassemblement des fragments ne peut survenir que si ces derniers sont amenés à proximité l'un de l'autre de manière assistée à l'aide de protéines interagissantes. Une fois que les domaines sont réassemblés, la protéine ubiquitin correctement repliée est reconnue par des protéases spécifiques à l'ubiquitin qui clivent et relâchent la DHFR identifiée avec l'épitope. Cette protéine rapporteuse ne possède plus la même masse moléculaire puisqu'elle n'est plus fusionnée au fragment C-terminal de l'ubiquitine. Ce changement de masse peut être observé par immunobuvardage. Il existe aussi des variations à ce système notamment pour l'étude de protéines membranaires (Stagljar *et al.*, 1998) et pours des modèles mammifères (Rojo-Niersbach *et al.*, 2000).

Le principe de séparer la protéine ubiquitin en deux parties distinctes est le fondement premier du PCA (Protein fragment Complementation Assay)(expliqué à la section 1.4). La possibilité de travailler en cellules mammifères ainsi qu'avec des protéines membranaires sont les avantages de cette méthode. La mesure de l'interaction protéique se fait de manière indirecte par immunobuvardage ou par activation transcriptionnelle ce qui rend difficile l'étude cinétique des complexes. De plus, il est impossible de localiser l'interaction à l'intérieur des cellules.

1.3.6. Autres méthodes

Il existe plusieurs autres méthodes permettant d'étudier les interactions protéine-protéine. La co-localisation, le système de recrutement SOS (SRS) (Aronheim *et al.*, 1997) et la complémentation de la beta-galactosidase (Blakely *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2000) sont aussi des méthodes permettant l'étude de l'association protéique.

1.4.PCA -- PROTEIN-FRAGMENT COMPLEMENTATION ASSAY

Depuis 1998, le laboratoire du Dr Stephen Michnick met au point le système PCA pour Protein fragment Complementation Assay (Pelletier *et al.*, 1998). Cette technique

permet d'étudier des interactions protéine-protéine avec une grande sensibilité et spécificité chez les bactéries (Pelletier *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1999; Arndt *et al.*, 2000) ou les cellules de mammifères (Remy *et al.*, 1999; Remy *et al.*, 1999). Il est aussi possible de réaliser des études cinétiques permettant ainsi de quantifier les interactions étudiées (Remy *et al.*, 1999). Cette technique est pleinement utilisée maintenant dans le laboratoire tel que pour l'étude des voies de signalisation de RAS/RAF, du récepteurs TGF-β, des protéines reliées à la mort cellulaire programmée ainsi que pour l'étude des résidus importants au repliement du domaine liant ras de raf. On crible aussi les voies de signalisation de $p70^{S6K}$ afin de déterminer de nouvelles interactions. Comme vous pouvez le remarquer ce système est utilisé dans plusieurs domaines de la recherche allant de la biologie cellulaire à l'étude fondamental du repliement des protéines. Plusieurs études ont déjà utilisé le PCA. Notamment l'étude de la dimérisation des protéines de type zipper de leucine (Pelletier *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1999; Arndt *et al.*, 2000), le système hétérodimérique FKBP/TOR (Remy *et al.*, 1999) ainsi que le changement de conformation du récepteur erythropoïétine (Remy *et al.*, 1999).

1.4.1. Principe et Design protéique

Le principe de base de la technique PCA consiste au réassemblement et au repliement assisté de deux fragments inactifs non repliés provenant d'une protéine rapporteuse. Cette dernière possède une activité mesurable pour laquelle des essais *in vitro* et/ou *in vivo* sont disponibles. Le réassemblement et le repliement sont dit assistés puisque les deux fragments sont incapables de se réassembler et de se replier sans l'assistance de protéines interagissantes (représenté à la figure #4) (Pelletier *et al.*, 1998). À la base du design du PCA, la protéine rapporteuse est d'abord scindée en deux parties ou fragments. Ces fragments polypeptidiques sont ensuite fusionnés aux protéines formant le complexe à étudier. Si les deux protéines sont capables d'interagir, la protéine rapporteuse sera apte à se replier dans une conformation permettant de produire son activité.

Le PCA diffère du système split ubiquitin pour une raison majeure : la protéine séparée en deux parties est en fait l'enzyme rapporteuse, ce qui n'est pas le cas avec le split

ubiquitin. Ce dernier système correspond à une mesure indirecte de l'interaction puisque la protéine étudiée par immunobuvardage ou via l'activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur sont séparées du système interagissant (Johnsson *et al.*, 1994; Stagljar *et al.*, 1998; Rojo-Niersbach *et al.*, 2000). Tandis que pour le PCA la protéine rapporteuse fait partie intégrante du système ce qui permet une mesure directe de l'interaction protéique étudiée (Pelletier *et al.*, 1998; Remy *et al.*, 1999).

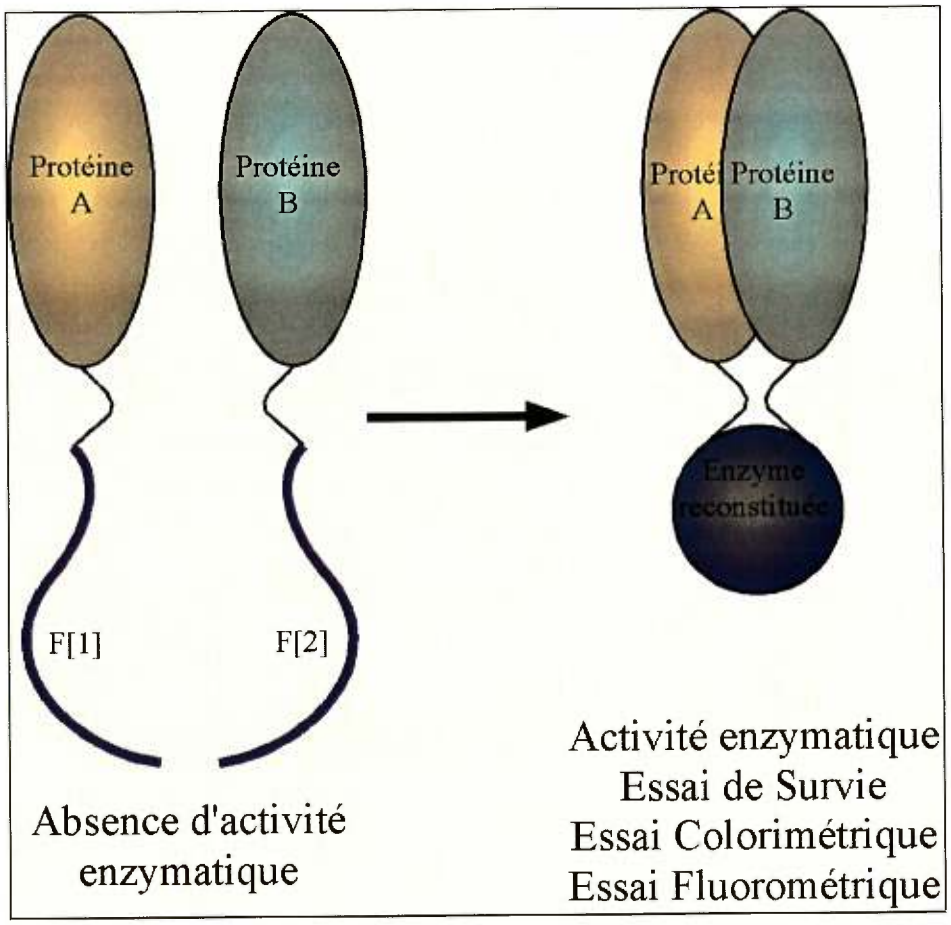
Le design protéique du PCA prend une place particulièrement importante dans l'établissement du système. Deux méthodes peuvent être utilisée afin de générer des fragments fonctionnels capables de recréer l'activité une fois réassociés : une approche aléatoire irrationnelle ou une approche rationnelle (Michnick *et al.*, 2000). Cette dernière méthode nécessite une étude approfondie de la structure et de la littérature permettant ainsi d'établir la localisation d'un site de coupe potentiel. Jusqu'à maintenant, nous avons toujours choisi de mettre au point les PCAs par une approche rationnelle. Lorsque l'on engendre un nouveau PCA, il est important de respecter certaines règles afin d'établir correctement et précisément l'emplacement du site de coupe. Tout le succès de l'essai repose sur le choix de ce site de coupure.

Premièrement, la structure de la protéine doit absolument être connue. Il est parfaitement clair que dans une approche logique, l'on ne peut se projeter dans l'inconnu, en coupant ici et là, sans connaître au préalable la structure tri-dimensionnelle de la protéine rapporteuse utilisée. De plus, une littérature exhaustive (mutagenèse, permutation circulaire, insertion de peptide, étude de repliement, structure d'homologue, alignement de séquence, etc.) de la protéine ne peut être que salutaire.

Deuxièmement, il faut choisir ce site de manière à ce qu'il soit situé à l'extérieur des éléments de structure secondaire de la protéine. Il faut porter l'attention surtout sur les boucles et éviter de toucher aux hélices alpha ainsi qu'aux feuillets bêta du coeur hydrophobe afin de ne pas perturber l'aspect général de la protéine. En effet, en coupant au milieu d'une structure secondaire importante, on peut modifier grandement le repliement de cette dernière et ainsi influencer le repliement complet de la protéine.

Figure #4 Principe de base du Protein-Fragment Complementation Assay (PCA).

Les protéines d'intérêts sont fusionnées via des espaceurs de 5 à 30 acides aminés (lignes noires) aux fragments inactifs et non repliés (F[1] et F[2]). Si les protéines sont capables d'interagir physiquement, l'enzyme rapporteuse sera alors en mesure de se replier convenablement et de reproduire son activité originale.


Protéine
A
Protéine
B
F[1]
F[2]
Absence d'activité
enzymatique
Protéine
A
Protéine
B
Enzyme
reconstituée
Activité enzymatique
Essai de Survie
Essai Colorimétrique
Essai Fluorométrique

Troisièmement, cette boucle ne devrait pas être impliquée au niveau du site actif et si possible située assez loin de celui-ci afin de minimiser l'effet perturbateur de la coupure sur l'activité rapporteuse de la protéine. De plus, cette boucle ne devrait pas interagir avec aucune autre structure secondaire. Pour ce faire, elle devrait être orientée vers l'extérieur de la structure globale de la protéine.

Finalement, ce site de coupure devrait être situé de manière à séparer la protéine en deux domaines de grandeur sensiblement semblable afin de réduire au minimum la présence d'un trop grand nombre d'éléments catalytiques sur un seul fragment ou encore le repliement partiel de ce dernier pouvant ainsi générer de l'activité. Ces prémices au design du site de coupure d'un PCA sont particulièrement importantes et ont été soigneusement respectées dans l'élaboration de la prochaine étude.

La topologie ou la séquence primaire d'une protéine est importante pour son repliement se produise de manière adéquate. Plus cette topologie est respectée dans le design du PCA plus le système devrait être efficace. C'est pourquoi une enzyme pert particulièrement de son activité originale lorsque sa séquence primaire est permutée. Des études de mutagenèse par insertion ou par permutation permettent de créer des différences importantes au niveau de la topologie normale d'une protéine et ainsi de savoir si la protéine est capable de se replier suite à de profond changement au niveau de la séquence primaire.

1.4.2. Le PCA de la DiHydroFolate Réductase--PCA DHFR

L'essai le plus développé est celui utilisant la mDHFR (dihydrofolate réductase murin (E.C. 1.5.1.3)) comme enzyme rapporteuse. Il s'agit d'une petite protéine monomérique de 21 kDa possédant une forte identité (91%) à sont homologue humain. Cette enzyme, engagée dans la biosynthèse du tétrahydrofolate à partir du dihydrofolate, est nécessaire à la voie de biosynthèse de la sérine, de la méthionine, des purines, du thymidylate et du pantholéate (bactéries seulement; Bertino *et al.*, 1968). La structure, le repliement, la catalyse et l'enzymologie de cette protéine ont été le sujet de plusieurs études

(Volz *et al.*, 1982; Bystroff *et al.*, 1991; Filman *et al.*, 1982; Oefner *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1995; Jennings *et al.*, 1993; Thillet *et al.*, 1990; Andrews *et al.*, 1989). Cet essai tire avantage du besoin absolu de la DHFR pour la survie cellulaire autant chez les procaryotes que chez les cellules de mammifères. Étant donné cette nécessité de l'enzyme pour la viabilité cellulaire, il fut suggéré un essai par lequel l'activité de l'enzyme rapporteuse permettrait la survie dans des souches cellulaires où la DHFR endogène est absente ou inactivée. Lorsqu'il y a présence d'une interaction physique entre deux protéines, le système permet la sélection clonale de cette interaction (Remy *et al.*, 1999). De plus, il est aussi possible de visualiser la localisation de l'interaction via une drogue (méthotrexate) à laquelle un groupement fluorescéine a été conjugué (Henderson *et al.*, 1980; Kaufman *et al.*, 1978). La localisation de l'interaction étudiée ainsi que la sélection clonale de l'interaction en cellules procaryotes ou de mammifères sont les principaux avantages du PCA-DHFR. Par contre, cette sélection clonale ne peut se réaliser qu'avec des souches cellulaires où l'activité de la DHFR est absente ou atténuée. De plus, dans des souches cellulaires où la DHFR est présente, l'essai manque de sensibilité en comparaison avec le bruit de fond provoquer par la DHFR endogène dû aussi à l'absence d'amplification enzymatique du système.

1.4.3. Autres PCA

Il existe, à ce jour, d'autres PCAs qui ont été mis au point par le laboratoire du Dr Michnick notamment celui de la GAR transformylase (glycinamide ribonucléotide transformylase) et ceux des protéines de résistance à la néomycine (aminoglycoside phosphotransferase) et à l'hygromycine B (hygromycine B phosphotransferase) (Michnick *et al.*, 2000). La GAR transformylase est une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des purines nécessaires à la réplication de l'ADN (Benkovic, 1980). La néomycine, ou la kanamycine, sont des composés chimiques capables d'inhiber la synthèse protéique aussi bien chez les procaryotes que les chez les cellules de mammifères (Bar-Nun *et al.*, 1983; Eustice *et al.*, 1984). L'hygromycine B interfère avec la translocation de l'ARNm et cause une mauvaise traduction de ce dernier (Cabanas *et al.*, 1978; Gonzalez *et al.*, 1978; Singh *et al.*, 1979). Ces drogues sont inhibées par une phosphorylation au niveau

de leur structure par une kinase encodée par les gènes de résistance à la néomycine et à l'hygromycine respectivement. Tous ces PCAs font appels à des essais de survie soit chez les procaryotes (GAR) ou encore chez les cellules de mammifères (Néo, Hygro). Ils permettent tous une sélection clonale dominante des interactions protéine-protéine étudiées.

1.4.4. PCA versus autres méthodes

Comme il l'a été démontré à la section précédente, plusieurs systèmes ont été développés afin d'identifier et d'analyser les interactions protéine-protéine. Le tableau I montre que chacune de ces méthodes présentent des avantages et des désavantages qui leurs sont propres.

1.5. UN NOUVEAU PCA — LE PCA DE LA β-LACTAMASE

Pourquoi chercher à mettre au point un nouveau PCA? Comme il l'a été démontré lors de nombreuses études, l'essai PCA-DHFR est un excellent système pour l'étude des interactions protéine-protéine. Il possède plusieurs avantages sur les autres systèmes notamment la sélection clonale qui sera toujours un atout particulièrement important sur les autres techniques. Par contre, l'essai ne peut-être utilisé *in vitro*, et montre un bruit de fond important dans les souches cellulaires où la DHFR est présente. De plus, la présence de ce bruit de fond rend la détection ainsi que l'analyse des données plutôt difficiles. C'est le manque d'amplification du signal ainsi que la présence de DHFR endogène qui empêche de palier l'effet de ce bruit de fond. Nous avons donc cherché à contrer ces limitations par le développement d'un nouveau PCA basée sur l'utilisation d'une nouvelle enzyme rapporteuse.

Le premier objectif du nouveau PCA était d'abord de rechercher une enzyme rapporteuse capable de nous donner un essai pouvant être utilisé aussi bien *in vitro* que *in vivo*, en cellules procaryotes et eucaryotes et possédant des substrats pouvant être modifiés pour retrouver une accumulation de produit et ainsi observer une amplification du signal.

Système	Types de cellule	Protéines membranaires	Localisation de l'interaction	Mesure directe ou indirecte	Amplification du signal	*In vitro* et/ou *in vivo*	Sélection clonale	Particularité
Double-hybride Fields *et al.*, 1989 Vidal *et al.*, 1999	Levure	Non	Non	Indirecte	Oui	*In vivo*	Oui	Très connu et très utilisé
FRET/BRET Selvin, 2000 Xu *et al.*, 1999	Pro/Euc	Oui	Oui	Directe	Non	*In vivo*	Non	Dépend de la qualité du transfert d'énergie
Co-immunoprécipitaion	Pro/Euc	Oui	Non	Directe	Non	*In vitro*	Non	Dépend de la qualité des anticorps
Système de recrutement SOS (SRS) Aronheim *et al.*, 1997	Levure	Non	Non	Indirecte	Oui	*In vivo*	Oui	Système spécifique à la levure
Complémentation β-galactosidase Rossi *et al.*, 1997	Pro/Euc	Oui	Non	Directe	Oui	*In vitro et in vivo*	Non	Peut être influencé par des contraintes stériques
Split-ubiquitin Johnsson *et al.*, 1994	Pro/Euc	Oui	Non	Indirecte	Oui	*In vivo*	Non	Base du PCA
PCA-DHFR Michnick *et al.*, 2000	Pro/Euc	Oui	Oui	Directe	Non	*In vivo*	Oui	Sélection clonale chez les CHO DUXB-11

Tableau I Résumé des principaux avantages et désavantages observés chez les diverses méthodes d'étude d'interaction protéine-protéine.

Il faut aussi que cette enzyme soit absente chez les cellules de mammifères afin de minimiser le bruit de fond endogène. De plus, si cette enzyme pouvait nous donner la possibilité de réaliser des études à grande échelle en plaque à 96 puits et de localiser là où les interactions surviennent au niveau cellulaire, nous aurions vraiment mis au point un essai universel pour l'étude des interactions protéines-protéines. Parmi toutes les enzymes retenues (GFP, luciférase, etc.), notre choix s'est arrêté sur l'enzyme bactérienne bêta(β)-lactamase. Puisqu'il existait plusieurs substrats permettant l'étude *in vitro* de la β-lactamase, c'est la mise au point d'un substrat (CCF2/AM) permettant l'étude *in vivo* de l'activité de la β-lactamase (Zlokarnik *et al.*, 1998) qui nous a influencé pour la β-lactamase. En effet, ce substrat fluorométrique permet des études de ratio en fluorescence.

1.5.1. Famille des Bêta(β)-lactamases

Les β-lactamases font parties d'une famille d'enzyme bactérienne hydrolysant très efficacement les pénicillines et les céphalosporines. Une classification, basée sur la structure primaire et proposée par Ambler, distingue les membres de cette famille en quatre grandes classes de β-lactamases – A, B, C et D[1](Ambler, 1980; Ambler *et al.*, 1991). Les enzymes de classe A, C et D sont des hydrolases à sérines tandis que les enzymes de classe B sont des métalloenzymes à zinc. Il existe une littérature particulièrement exhaustive pouvant être consultée telle que pour la structure tri-dimensionnelle (section 1.5.2), la mutagenèse (tableau II), le mécanisme d'hydrolyse (section 1.5.3) ainsi que pour les substrats et les inhibiteurs (section 1.5.4). Les enzymes β-lactamases se montrent un choix intéressant puisqu'elles satisfont toutes les exigences recherchées pour la mise au point d'un nouveau PCA. En effet, les enzymes de cette famille sont très utilisées en biologie moléculaire particulièrement chez les procaryotes mais aussi pour quelques études chez les cellules de mammifères (Zlokarnik *et al.*, 1998; Zlokarnik, 2000; Legendre *et al.*, 1999;

[1] Étant donné que les enzymes appartenant à la famille des β-lactamases sont classées selon leur structure primaire, les régions homologues entre les membres de la classe A divergent au niveau de la numérotation naturelle. Afin de limiter la confusion, il a été proposé une numérotation standard pour cette classe de protéine(Ambler *et al.*, 1991). Cette numérotation porte le nom de numérotation de Ambler ou encore ABL pour classe A Bêta-Lactamase. Pour la suite de ce mémoire, cette numérotation sera employée sauf si une mention contraire y est faite.

Raz *et al.*, 1998). Il est aussi possible d'étudier ces enzymes grâce à plusieurs substrats et inhibiteurs employés pour des essais *in vivo* ou *in vitro*. Certains de ces substrats sont colorimétriques (O'Callaghan *et al.*, 1972; Jones *et al.*, 1982; Moore *et al.*, 1997), d'autres sont fluorométriques (Zlokarnik *et al.*, 1998) mais la plupart permettent la sélection en conférant une résistance, chez les bactéries, à des antibiotiques tels que l'ampicilline ou la pénicilline (Bear *et al.*, 1970). Ces enzymes permettent aussi l'amplification d'un signal via l'accumulation de produits (Moore *et al.*, 1997). De plus, cette famille de protéine n'est pas présente chez les cellules mammifères ce qui nous laisse présager l'absence totale de bruit de fond provenant de protéines endogènes peu importe la souche cellulaire mammifère utilisée (Moore *et al.*, 1997).

Une isoforme particulièrement bien caractérisée de cette famille d'enzyme est la β-lactamase TEM-1 (E.C. 3.5.2.6) appartenant à la classe A (Sutcliffe, 1978). Il s'agit d'une protéine de 29 kDa encodée par le gène de résistance à l'ampicilline amp^r (ou bla) provenant de *Escherichia coli* (séquence primaire représentée à la figure #5). Ce gène est facilement accessible puisqu'il est présent chez la majorité des plasmides de clonage. Le produit de ce gène résulte en une protéine de 286 acides aminés de long. Les 23 premiers acides aminés agissent à titre de peptide signal (présenté en lettre blanche sur la figure #5) permettant la sécrétion de l'enzyme dans le périplasme bactérien où elle peut exercer son action antibiotique (Kadonaga *et al.*, 1984). Une fois dans le périplasme, cette séquence signal est éliminée afin de permettre à l'enzyme d'être pleinement fonctionnelle. De plus, il a été démontré que si on élimine cette région de 23 acides aminés, l'enzyme ne peut-être exportée et s'accumule dans le cytoplasme (Kadonaga *et al.*, 1984). L'on retrouve aussi un pont disulfure entre les acides aminés 75 et 121 mais ce pont n'est présent que sur un seul isoforme (TEM-1) de la famille des β-lactamases (Vanhove *et al.*, 1997). La région comprise entre les acides aminés 161 et 179 porte le nom de la boucle oméga (Ω). Elle porte ce nom due à sa forme très ressemblante à la lettre grecque Ω (illustré en jaune sur la figure #5 et #6; Banerjee *et al.*, 1998). Cette boucle contient des résidus particulièrement importants soit à la catalyse ou afin de maintenir une bonne topologie au niveau du site actif. Des mutations ou insertions au niveau de cette région changent de manière importante le spectre de résistance de l'enzyme (Banerjee *et al.*, 1998).

1.5.2. Structure générale de la β-lactamase

Afin de mettre au point le nouveau PCA de la β-lactamase (PCA-β-lactamase), une étude approfondie de la structure de l'enzyme est fortement recommandée. Dans les prochaines sections nous verrons comment la β-lactamase ainsi que sa cavité catalytique sont structurées. De plus, nous verrons aussi le mécanisme enzymatique employé par celle-ci pour produire son activité. Plusieurs études cristallographiques ont été réalisées sur la β-lactamase incluant la protéine de type sauvage (Herzberg *et al.*, 1987; Herzberg, 1991; Jelsch *et al.*, 1993; Jelsch *et al.*, 1992; Jelsch *et al.*, 1992; Paetzel *et al.*, 2000), la protéine mutée (Zawadzke *et al.*, 1995; Maveyraud *et al.*, 1996; Swaren *et al.*, 1995), la protéine complexée à divers substrats (Maveyraud *et al.*, 1998; Jamin *et al.*, 1994; Ness *et al.*, 2000) ainsi que l'intermédiaire mécanistique de l'enzyme (Strynadka *et al.*, 1992; Strynadka *et al.*, 1996). Cette source importante de renseignement nous permettra plus tard de bien choisir le site de coupure afin de mettre au point notre nouveau PCA. Voici un résumé des principales particularités caractérisant la structure de la β-lactamase.

La structure générale de l'enzyme consiste en une forme ellipsoïdale constituée de deux domaines (représenté à la figure #6A). Le premier domaine est représenté par les 40 premiers résidus situés en position N-terminal ainsi que les 75 derniers résidus situés en position C-terminal de la séquence primaire de l'enzyme. Il est constitué d'hélices alpha (α) et d'un feuillet bêta (β) et porte le nom de domaine α/β (représenté en rouge sur la figure #6A). Les structures secondaires qui le composent sont organisées de manière à former une couche de deux hélices α accolées à un feuillet β composé de cinq brins anti-parallèles. Ce type de repliement est appelé β-sandwich à face ouverte (Richardson, 1981). Mais contrairement aux protéines ayant ce type de repliement, la face ouverte du domaine n'est pas exposée au solvant. En effet, le deuxième domaine, comprenant les 140 acides aminés centraux, se replie dans un assortiment d'hélices α qui s'accolent à la face ouverte du β-sandwich et porte le nom de domaine α (représenté en vert sur la figure #6A). La chaîne polypeptidique croise d'un domaine à l'autre via deux boucles (représentées en bleues sur la figure #6A).

Figure #5 Séquence nucléotidique (5'-3') et protéique de l'isoforme TEM-1 de la β-lactamase.

Le peptide signal de 23 acides aminés est en lettres blanches, le domaine α/β est en lettres rouges et le domaine α est en lettres vertes. Les boucles reliants les deux domaines sont en bleues tandis que la boucle Ω appartenant au domaine α est de lettrage vert sur fond jaune. Il faut noter que la numérotation de Ambler est utilisée (Ambler *et al.*, 1980).

ATG	AGT	ATT	CAA	CAT	TTC	CGT	GTC	GCC	CTT	ATT	CCC	TTT	TTT	GCG	GCA
M	S	I	Q	H	F	R	V	A	L	I	P	F	F	A	A
49/19															94/34
TTT	TGC	CTT	CCT	GTT	TTT	GCT	CAC	CCA	GAA	ACG	CTG	GTG	AAA	GTA	AAA
F	C	L	P	V	F	A	H	P	E	T	L	V	K	V	K
97/35															142/50
GAT	GCT	GAA	GAT	CAG	TTG	GGT	GCA	CGA	GTG	GGT	TAC	ATC	GAA	CTG	GAT
D	A	E	D	Q	L	G	A	R	V	G	Y	I	E	L	D
145/51															190/66
CTC	AAC	AGC	GGT	AAG	ATC	CTT	GAG	AGT	TTT	CGC	CCC	GAA	GAA	CGT	TTT
L	N	S	G	K	I	L	E	S	F	R	P	E	E	R	F
193/67															238/82
CCA	ATG	ATG	AGC	ACT	TTT	AAA	GTT	CTG	CTA	TGT	GGC	GCG	GTA	TTA	TCC
P	M	M	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L	S
241/83															286/98
CGT	ATT	GAC	GCC	GGG	CAA	GAG	CAA	CTC	GGT	CGC	CGC	ATA	CAC	TAT	TCT
R	I	D	A	G	Q	E	Q	L	G	R	R	I	H	Y	S
289/99															334/114
CAG	AAT	GAC	TTG	GTT	GAG	TAC	TCA	CCA	GTC	ACA	GAA	AAG	CAT	CTT	ACG
Q	N	D	L	V	E	Y	S	P	V	T	E	K	H	L	T
337/115															382/130
GAT	GGC	ATG	ACA	GTA	AGA	GAA	TTA	TGC	AGT	GCT	GCC	ATA	ACC	ATG	AGT
D	G	M	T	V	R	E	L	C	S	A	A	I	T	M	S
385/131															430/146
GAT	AAC	ACT	GCG	GCC	AAC	TTA	CTT	CTG	ACA	ACG	ATC	GGA	GGA	CCG	AAG
D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T	I	G	G	P	K
433/147															478/162
GAG	CTA	ACC	GCT	TTT	TTG	CAC	AAC	ATG	GGG	GAT	CAT	GTA	ACT	CGC	CTT
E	L	T	A	F	L	H	N	M	G	D	H	V	T	R	L
481/163															526/178
GAT	CGT	TGG	GAA	CCG	GAG	CTG	AAT	GAA	GCC	ATA	CCA	AAC	GAC	GAG	CGT
D	R	W	E	P	E	L	N	E	A	I	P	N	D	E	R
529/179															574/194
GAC	ACC	ACG	ATG	CCT	GTA	GCA	ATG	GCA	ACA	ACG	TTG	CGC	AAA	CTA	TTA
D	T	T	M	P	V	A	M	A	T	T	L	R	K	L	L
577/195															622/210
ACT	GGC	GAA	CTA	CTT	ACT	CTA	GCT	TGC	CGG	CAA	CAA	TTA	ATA	GAC	TGG
T	G	E	L	L	T	L	A	S	R	Q	Q	L	I	D	W
625/211															670/226
ATG	GAG	GCG	GAT	AAA	GTT	GCA	GGA	CCA	CTT	CTG	CGC	TCG	GCC	CTT	CCG
M	E	A	D	K	V	A	G	P	L	L	R	S	A	L	P
673/227															718/242
GCT	GGC	TGG	TTT	ATT	GCT	GAT	AAA	TCT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT
A	G	W	F	I	A	D	K	S	G	A	G	E	R	G	S
721/243															766/258
CGC	GGT	ATC	ATT	GCA	GCA	CTG	GGG	CCA	GAT	GGT	AAG	CCC	TCC	CGT	ATC
R	G	I	I	A	A	L	G	P	D	G	K	P	S	R	I
769/259															814/274
GTA	GTT	ATC	TAC	ACG	ACG	GGG	AGT	CAG	GCA	ACT	ATG	GAT	GAA	CGA	AAT
V	V	I	Y	T	T	G	S	Q	A	T	M	D	E	R	N
817/275													856/290		
AGA	CAG	ATC	GCT	GAG	ATA	GGT	GCC	TCA	CTG	ATT	AAG	CAT	TGG	TAA	
R	Q	I	A	E	I	G	A	S	L	I	K	H	W	*	

La cavité catalytique est précisément située dans une dépression entre ces deux domaines (figure #6A et #6B). La boucle Ω, représentée en jaune sur la figure #6A, se situe tout près du site actif.

1.5.2.1. Structure et design du site actif

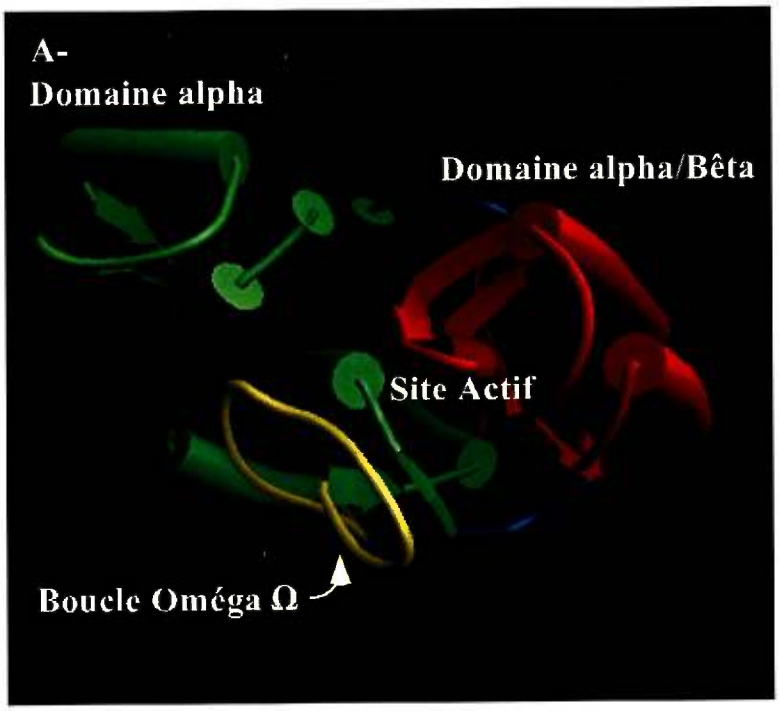
Au niveau de la structure du site actif, plusieurs éléments sont particulièrement bien conservés à travers tous les membres de la famille des β-lactamases. Ces éléments sont soit directement ou indirectement impliqués au niveau de la reconnaissance du substrat et/ou de l'activité catalytique (représenté à la figure #8).

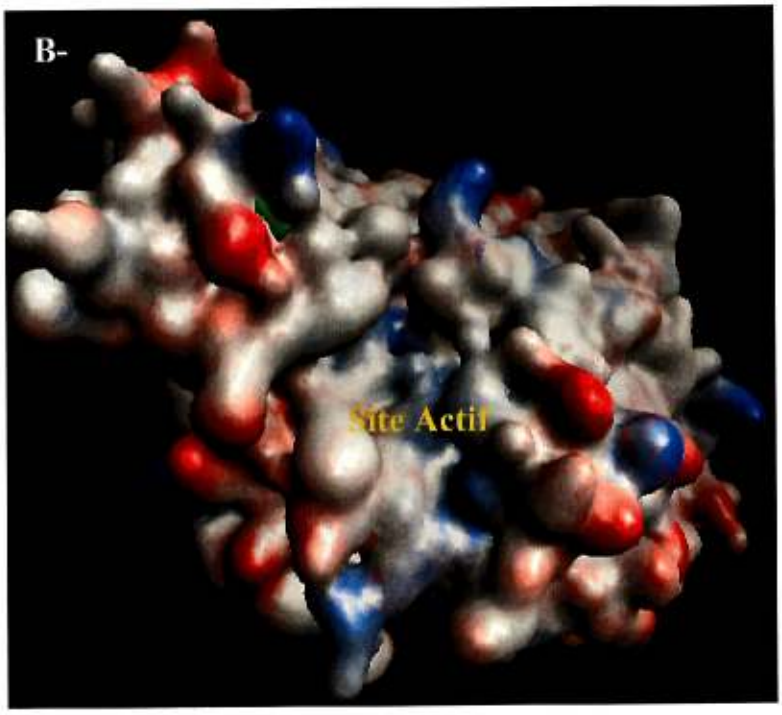
Le premier élément contient la $Sér^{70}$ active, ainsi qu'un tour d'hélice plus loin, une Lys^{73} dont les deux chaînes latérales pointent directement vers l'intérieur du site actif. Ces deux résidus font partis de la séquence conservée Sér-Xa.a.-Xa.a.-Lys. La sérine 70 est directement impliquée au niveau de la catalyse (réaction d'acylation) du substrat (Matagne *et al.*, 1998).

Le deuxième élément est situé dans une boucle du domaine α, où elle forme un des côtés de la cavité catalytique. La séquence conservée de ce second élément est Ser-Xaa-Asn. Chez les β-lactamases de classe A, le motif SDN pour $Sér^{130}$-Asp^{131}-Asn^{132} est pratiquement invariable. Les chaînes latérales du premier et du troisième acide aminé sont directement pointées vers le centre actif. Cet élément est nécessaire afin de stabiliser le substrat dans la poche d'hydrolyse (Matagne *et al.*, 1998) et l'hydrogène du groupement hydroxyle appartenant à la sérine 130 sert à la protonation de l'azote du cycle β-lactam du substrats (figure #9) (Atanasov *et al.*, 2000). Le troisième élément est situé sur un des brins (celui le plus à l'intérieur) du feuillet β appartenant au domaine α/β et forme le côté opposé de la cavité catalytique. La séquence généralement retrouvée est Lys^{234}-Thr^{235}-Gly^{236}. Parfois la lysine est remplacée par une histidine et la thréonine par une sérine, par contre la séquence conservée comporte toujours un acide aminé ayant une chaîne latérale chargée positivement suivi d'un autre ayant un groupement hydroxylé.

Figure #6 Structure générale de la β-lactamase TEM-1 à une résolution de 1,8 Å.

A- Structure cristallographique de la β-lactamase TEM-1. Le domaine α est illustré en vert, tandis que le domaine α/β est de couleur rouge. La boucle Ω est située dans le domaine α et est de couleur jaune. Les domaines sont reliés deux fois par des boucles illustrées en bleues. **B-** Les surfaces de la β-lactamase sont montrées afin de bien illustrer la cavité formée par les deux domaines et ainsi indiquer où se situe le site actif. Réalisé avec Weblab Viewlite 3.2. à partir du fichier PDB 1TEM.


A-
Domaine alpha
Domaine alpha/Bêta
Site Actif
Boucle Oméga Ω


B-
Site Actif

Le troisième membre de cette triade LTG est une glycine qui naturellement est dépourvue de chaîne latérale. Cet acide aminé est conservé universellement à travers la famille des β-lactamases. Introduire une chaîne latérale à cette position empêcherait sévèrement l'approche du substrat pour la poche enzymatique (Joris *et al.*, 1988). Le quatrième et dernier élément est composé d'acides aminés chargés négativement. Ces résidus sont situés parmi les 16 à 19 acides aminés (Arg^{161}- Asn^{179}) formant la boucle Ω. Ils correspondent à la séquence Glu^{166}-Xaa-Glu-Leu-Asn^{170} où les deux résidus Glu^{166} et Asn^{170} sont absolument essentiels au positionnement d'une molécule d'eau très importante tout près de la sérine active (Lamotte-Brasseur *et al.*, 1991).

1.5.3. Analyse mécanistique et structure de l'intermédiaire acyl-enzyme

Même si la structure tri-dimensionnelle l'enzyme est très bien caractérisée et cela depuis longtemps, il n'en reste pas moins que le mécanisme d'hydrolyse de la β-lactamase est resté, pendant un grand nombre d'année, très controversé. En effet, c'est tout dernièrement que le mécanisme d'hydrolyse fut pleinement compris (Atanasov *et al.*, 2000). Le processus d'hydrolyse le plus accepté est celui de l'intermédiaire acyl-enzyme (représenté à la figure #7) impliquant l'acide aminé actif $Sér^{70}$ (représenté à la figure #9) (Christensen *et al.*, 1990; Philippon *et al.*, 1998; Matagne *et al.*, 1998). Longtemps, on a pensé que les doublets libres provenant de l'oxygène du groupement hydroxyle de la sérine 70 étaient les responsables du déclanchement de la réaction d'acylation (premier événement de la réaction d'hydrolyse représenté à la figure #9).

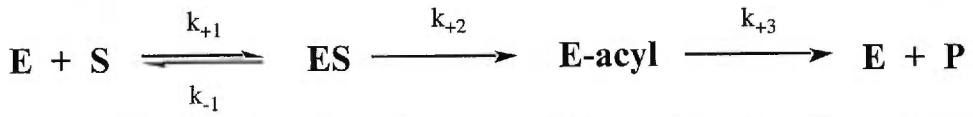
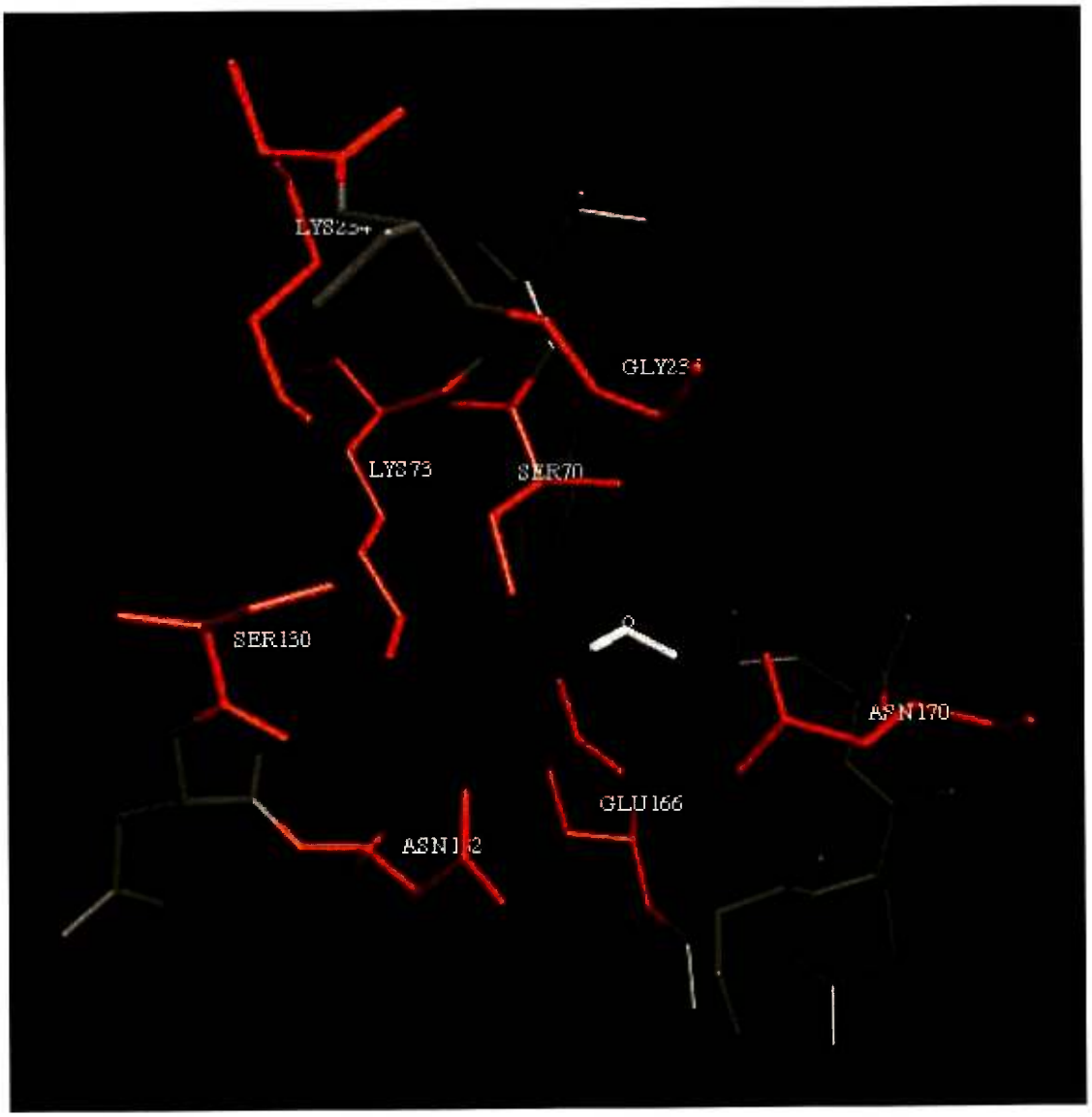


Figure #7 Schéma du mécanisme d'hydrolyse impliquant un intermédiaire acyl-enzyme.

E représente l'enzyme, **S** le substrat, **ES** l'intermédiaire Henri-Michaelis, **E-acyl** l'intermédiaire acyl-enzyme et **P** le produit.

Figure #8 Structure cristallographique du site actif de la β-lactamase TEM-1 à une résolution de 1,8 Å.

Représentation en bâtonnet des éléments conservés formant la cavité enzymatique chez la β-lactamase TEM-1. Les résidus impliqués dans la catalyse sont colorés en rouges et identifiés. Le premier élément s'étend de la Ser^{70} à la Lys^{73}, le deuxième de la Ser^{130} à l'Asn^{132}, le troisième de la Lys^{234} à la Gly^{236} et le dernier élément s'étale de Glu^{166} à l'Asn^{170}. De plus la molécule d'eau impliquée dans le processus de catalyse est aussi montrée. Réalisé avec Weblab Viewlite 3.2. à partir du fichier PDB 1TEM.


LYS234
GLY234
LYS73
SER70
SER130
ASN170
GLU166
ASN112

Par contre, tout récemment, il fut prouvé hors de tout doute que l'évènement à l'origine de l'hydrolyse est en fait la protonation de l'azote sur le cycle β-lactam du substrat (présenté à la figure #9 et #10; Atanasov *et al.*, 2000). Ensuite la Sér^{70} fait une attaque nucléophilique sur le carbonyle permettant, suite à un réarrangement électronique, l'ouverture du cycle. Cette attaque correspond à la réaction d'acylation.

Finalement, une molécule d'eau avec l'aide de Glu^{166} (stabilisation via pont hydrogène), vient terminer la réaction en attaquant le carbonyle, permettant ainsi la libération du produit et de l'enzyme régénérée. Il s'agit de la réaction de déacylation (figure #9).

La structure cristallographique de l'intermédiaire acyl-enzyme à été déterminée et caractérisée à une résolution de 1,7 Å (Strynadka *et al.*, 1992). Il s'agit de la β-lactamase TEM-1 complexée à un inhibiteur de type boronate et directement associée à la sérine 70 active. Selon cet intermédiaire, représentée à la figure #10B, on peut remarquer que la Sér^{70} (en bleu) est liée de manière covalente avec le carbonyle du cycle β-lactam de l'inhibiteur. Il faut aussi noter la présence d'un réseau important de ponts hydrogènes dont le principal but est de stabiliser l'état de transition de l'intermédiaire acyl-enzyme (figure #10A). De plus, on peut remarquer la présence d'une molécule d'eau (représentée en bleue, à droite de la Sér^{70} sur la figure #10A et #10B) conservée dans toutes les structures tri-dimensionnelles des β-lactamases de la classe A (Strynadka *et al.*, 1992). Il semble que ce soit cette molécule d'eau qui attaque le carbonyle (représenté en jaune sur la figure #10B) afin de libérer l'enzyme et le produit par la réaction de déacylation (Atanasov *et al.*, 2000).

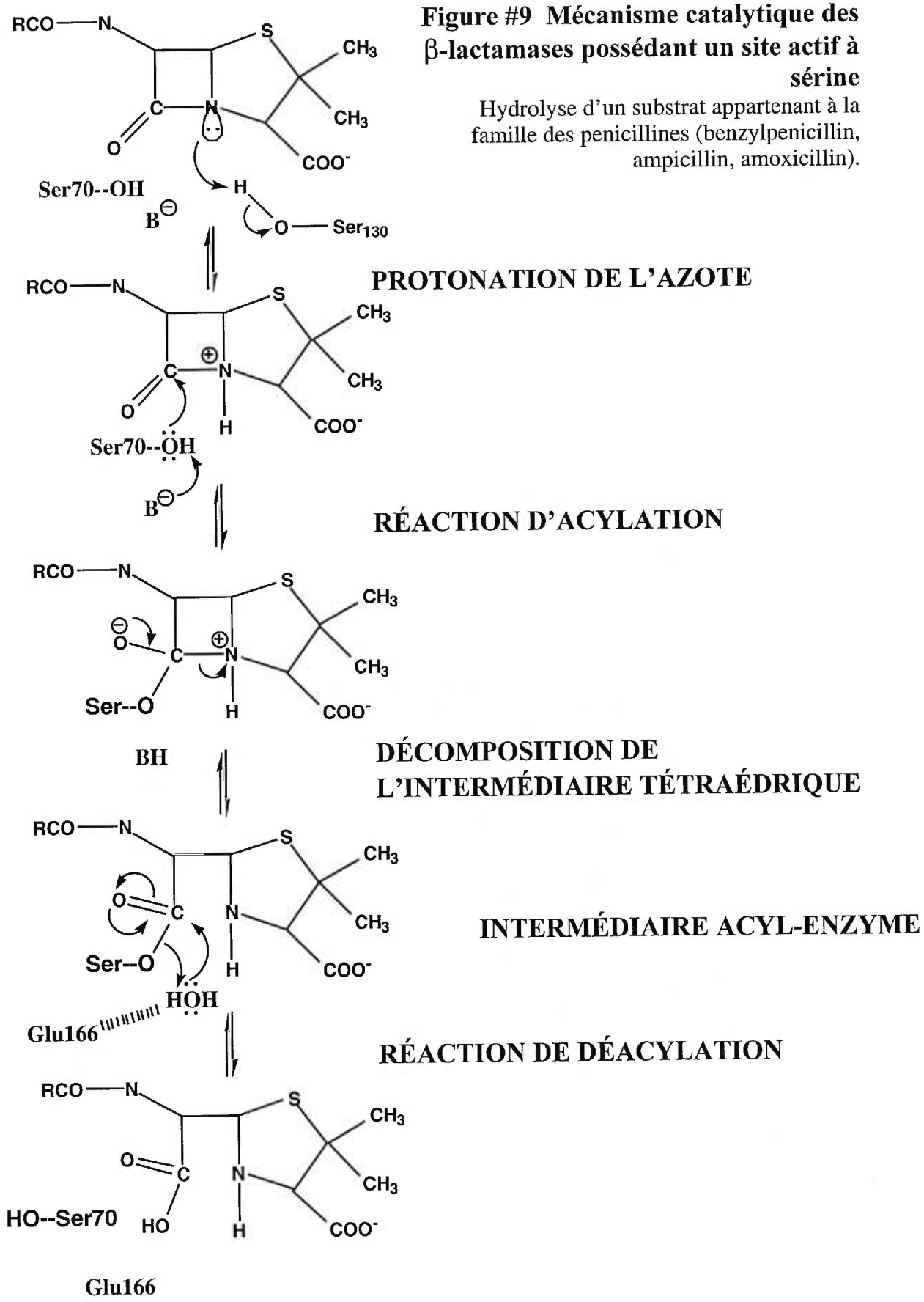
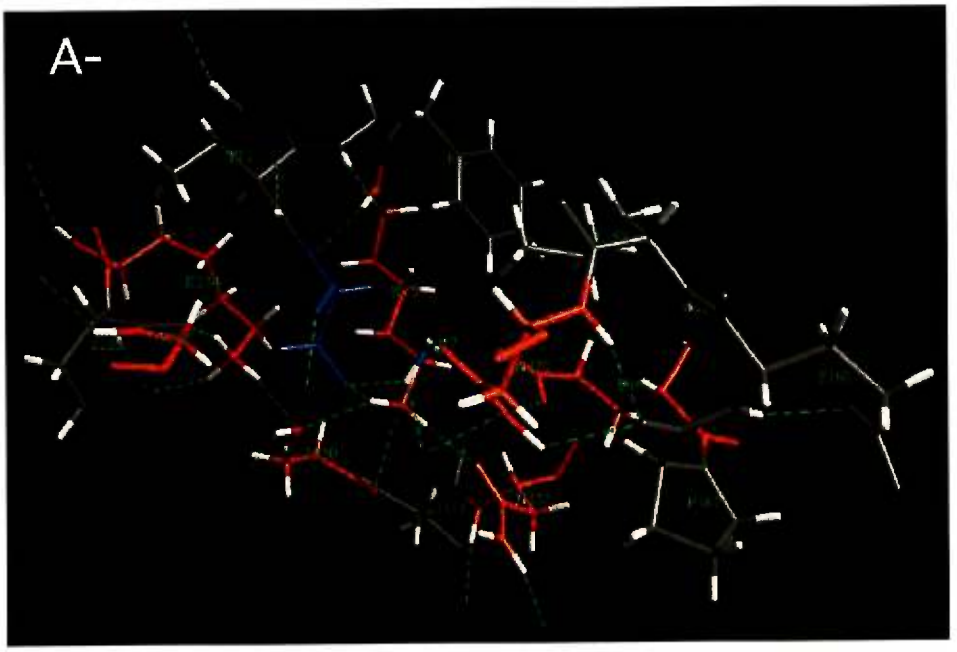


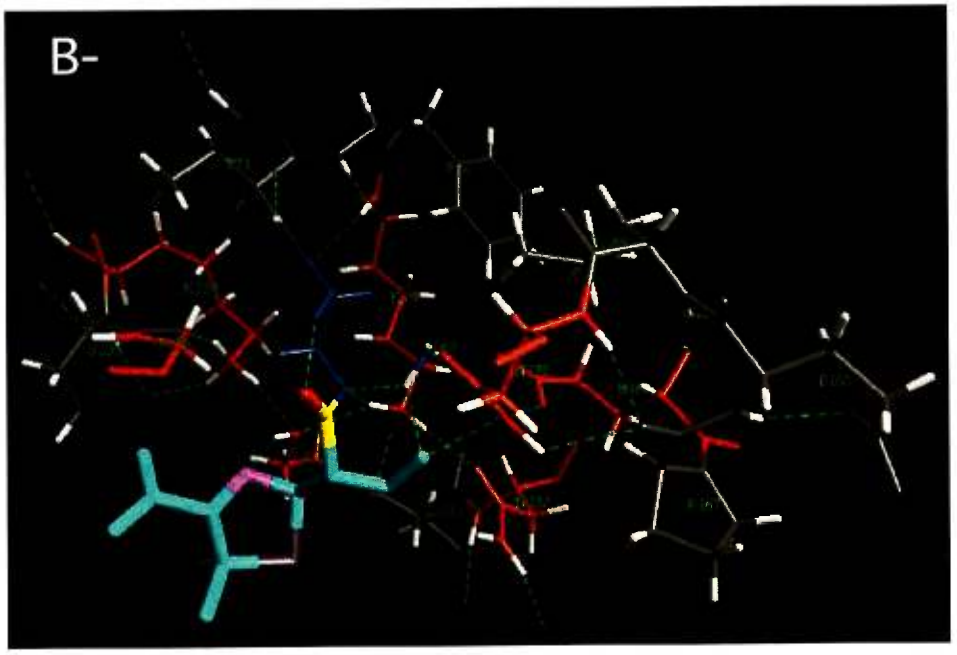
Figure #9 Mécanisme catalytique des β-lactamases possédant un site actif à sérine

Hydrolyse d'un substrat appartenant à la famille des penicillines (benzylpenicillin, ampicillin, amoxicillin).

Figure #10 Représentation structurale de l'intermédiaire acyl-enzyme de la β-lactamase TEM-1 à une résolution de 1.7Å.

A- Représentation en bâtonnets du site actif de la β-lactamase en absence du substrat. La sérine 70 est mis en évidence par une couleur bleue. La molécule d'eau importante à l'hydrolyse est située juste à droite en bleue. Noter le réseau de ponts hydrogènes en vert, présent afin de bien stabiliser l'intermédiaire. **B-** Complexe acyl-enzyme représenté par l'association covalente de l'inhibiteur boronate. Ce dernier est coloré en turquoise, son azote est de couleur violet tandis que le souffre, le carbonyle et l'oxygène sont respectivement de couleur mauve, jaune et rouge. Réalisé avec Weblab Viewlite 3.2. à partir du fichier PDB 1ERQ.


A-


B-

1.5.4. Mutagénèse de la β-lactamase

Étant donné la capacité de conférer une résistance bactérienne et leur importance biologique, les β-lactamases furent pendant longtemps des enzymes de prédilection pour des études de mutagenèse. Ainsi il existe un nombre important de mutants de ces protéines. Ces mutants sont sans compter tous les autres membres de la famille de la classe A, TEM-2 à TEM-68, possédant toutes la même séquence en acides aminés à l'exception de 1 à 4 mutations ponctuelles en acides aminés (Matagne *et al.*, 1998). Le tableau II résume la majorité des études de mutagenèse effectuées sur les β-lactamases ainsi que les effets répertoriés[2].

[2] Pour simplifier l'étude, seul les mutations sur les résidus conservés sont énumérées.

Mutants de TEM-1	Observations	Référence :
E166N, E166H E166D, E166A, E166Q	Diminution importante de la réaction d'hydrolyse (déacylation)	Guillaume *et al.*, 1997 Adachi *et al.*, 1991
W165S, A237T, E240C A237T:E240C W165S:A237T:E240C	Toutes ces mutations augmentent la spécificité de l'enzyme pour les céphalosporines et diminuent celle pour les penicillines.	Cantu *et al.*, 1997
G238A, G238S, G238C G238T, G238N, G238V	Les mutations qui augmentent le réseau de liaisons hydrogènes telles que Sér, Thr et Asn, augmentent le spectre d'hydrolyse de la β-lactamase	Cantu *et al.*, 1998
L76N, L76N:M182T L76S, L76S:M182T M69I, M69I:M182T I47Y:E48C I47Y:E48C:M182T	Les mutation en 47-48, 69 et 76 abolissent l'activité de l'enzyme. Par contre, la mutation M182T restore partiellement cette activité. La mutation M182T agit à titre de suppresseur global. M182T supprime le mauvais repliement et l'aggrégation de l'enzyme	Huang *et al.*, 1997 Sideraki *et al.*, 2000
N170L	La déacylation se fait par réarrangement intramoléculaire non plus par hydrolyse.	Lewis *et al.*, 1997
Y105F	Tyr 105 n'est pas essentiel à l'activité de la β-lactamase et ne contribue pas à la liaison du substrat	Escobar *et al.*, 1994
E104T, E104S, E104K, E104R, E104Y, E104P	Pas de modification drastique de l'activité sauf pour E104K qui semble plus active.	Petit *et al.*, 1995
M69L, R244Q, R244T	Ces mutations permettent à l'enzyme d'hydrolyser le sulbactam ainsi que l'acide clavulanique, des inhibiteurs suicidaires de la β-lactamase	Delaire *et al.*, 1992
K234T, K234R	La lysine 234 est impliquée dans la reconnaissance du substrat ainsi que la stabilisation de l'état de transition	Lenfant *et al.*, 1991
E166Y, E166Y:R164S	Ces mutations augmentent les spectres d'hydrolyse de la β-lactamase R164S diminue la rigidité de la boucle Ω	Maveyraud *et al.*, 1996
C77S	La délétion du pont cystéine entraîne une diminution importante de l'énergie de stabilisation de l'enzyme	Vanhove *et al.*, 1997
A237G, E240K G238S:E240K A237G:G238S:E240K	Observations diverses selon le nombre de mutation ainsi que les substrats utilisés. Détermine la spécificité du substrat pour certaines drogues.	Cantu *et al.*, 1996
K73R, E166D K73R:E166D	Diminution importante de la réaction d'hydrolyse (déacylation)	Gibson *et al.*, 1990
G238S, E240K, R241G G238S:E240K	Ces mutations augmentent les propriétés catalytiques de la β-lactamase de 100 fois.	Venkatachalam *et al.*, 1994

Tableau II Résumé de la mutagenèse

1.5.5. Substrats

Il existe une abondance de substrat pour tester l'activité de la β-lactamase. Ceux-ci sont, pour la majorité, des antibiotiques qui empêchent la croissance bactérienne en inhibant, habituellement, la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne (ampicilline, carbenicillin, cefotaxime) (illustré à la figure #11A) (Matagne *et al.*, 1998). Ces substrats sont séparés en deux grandes familles selon leur structure. La première famille est représentée structurellement par un cycle β-lactam associé à un cycle à cinq atomes et porte le nom des pénicillines (ampicilline, carbenicillin, benzyl-penicillin). Tandis que la seconde famille est appelée céphalosporines et correspond à un cycle β-lactam associé à un cycle à six atomes. Les β-lactamases clivent plus ou moins bien ces substrats et permettent ainsi la croissance bactérienne.

Normalement, cette activité de la β-lactamase est déterminée par la concentration minimal d'inhibition (CMI). Cette concentration correspond à celle où l'activité de la β-lactamase est incapable de protéger la cellule bactérienne de l'effet de l'inhibiteur (substrat de la β-lactamase). Par contre, étant donné que ces effets antibiotiques ne sont utilisables qu'avec les cellules bactériennes, nous avons dû nous concentrer sur d'autres substrats. Deux substrats sont utilisés dans cette étude, le premier est un substrat colorimétrique appelé nitrocéfine (O'Callaghan *et al.*, 1972) et le deuxième est un substrat fluorométrique appelé CCF2-AM (Zlokarnik *et al.*, 1998).

1.5.5.1. Nitrocéfine

La nitrocéfine est une céphalosporine permettant de mesurer l'activité de la β-lactamase par un essai colorimétrique *in vitro*. En effet, ce substrat est de couleur jaune et devient rouge clair lorsque le cycle β-lactam est hydrolysé par l'action de la β-lactamase (illustré à la figure #12A). L'enzyme TEM-1 possède une activité kcat/Km de 17000 $mM^{-1}*s^{-1}$.

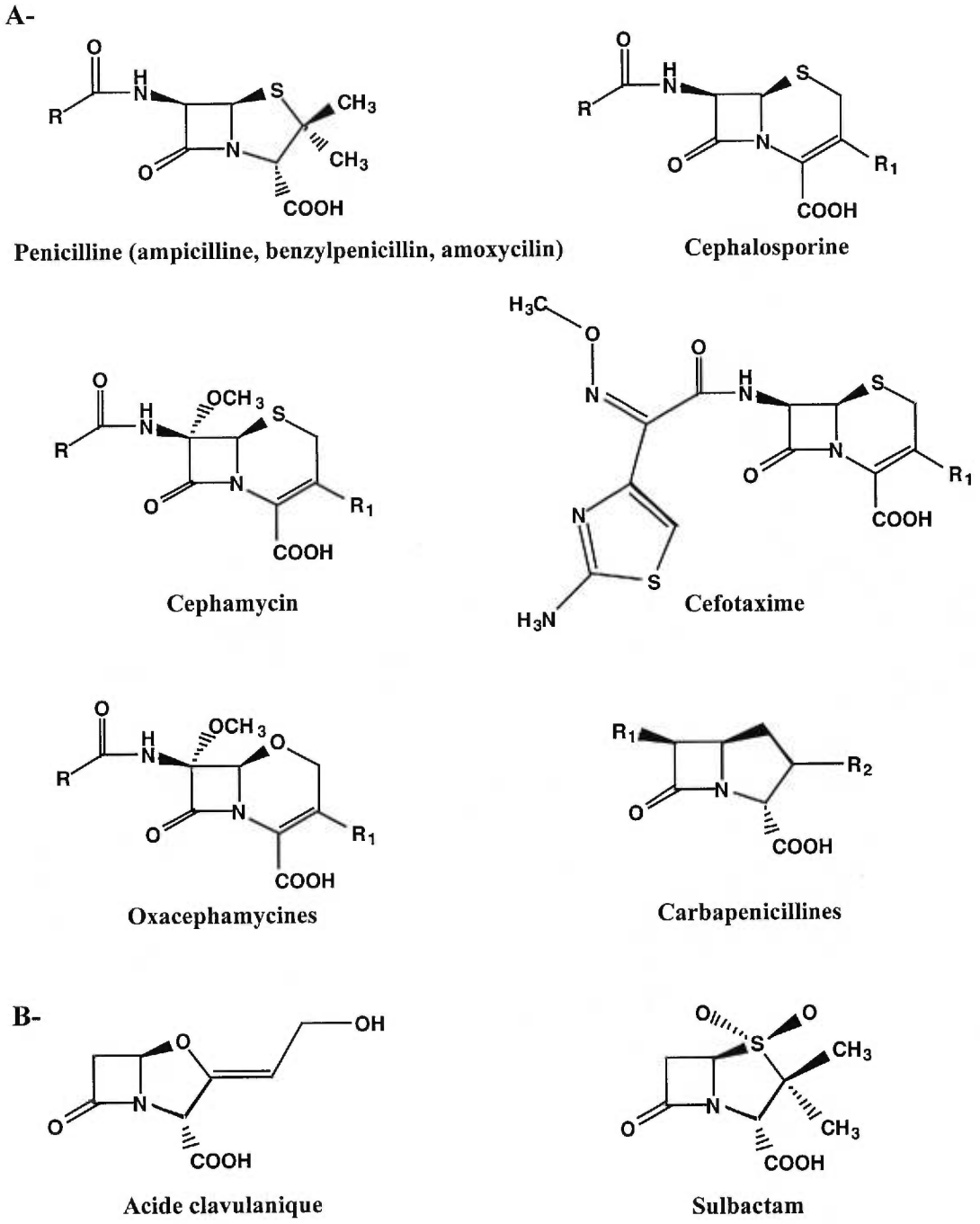


Figure #11 : Structure chimique des principaux substrats et inhibiteurs.

A- Substrats de types pénicillines et céphalosporines. **B-** Inhibiteurs de la β-lactamase

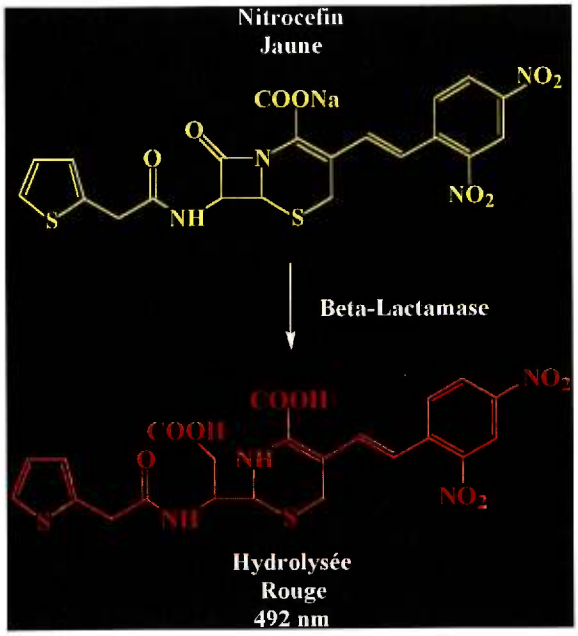
L'hydrolyse du substrat peut être suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 492 nm en mesurant l'apparition de couleur rouge en fonction du temps permettant ainsi de déterminer un taux d'hydrolyse. Malheureusement, ce substrat est incapable de traverser les parois cellulaires procaryotes ou eucaryotes ce qui rend impossible les tests *in vivo*. Par contre, il n'est pas onéreux et très simple à utiliser.

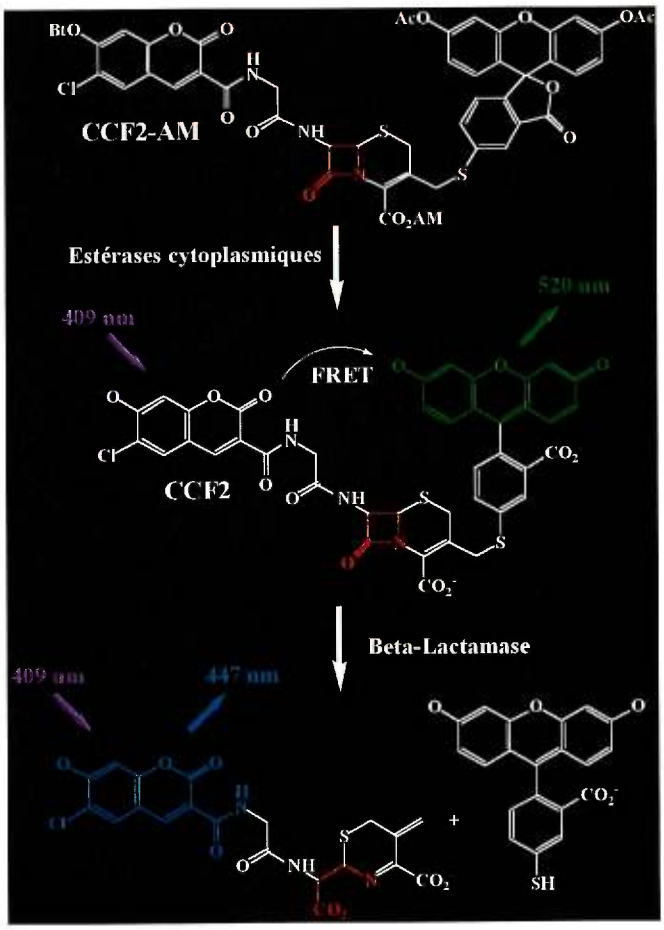
1.5.5.2. CCF2-AM

Le second substrat est aussi une céphalosporine et est appelé CCF2-AM. Ce substrat est utilisé pour des essais fluorométriques *in vivo*. La β-lactamase TEM-1 est moins efficace pour hydrolyser le CCF2-AM que pour la nitrocéfine mais possède tout de même un kcat/Km de 1260 $mM^{-1}*s^{-1}$ pour ce substrat. Le CCF2-AM a la particularité de pouvoir diffuser à travers les membranes plasmiques cellulaires permettant ainsi des études *in vivo*. Une fois à l'intérieur des cellules, des estérases cytoplasmiques catalysent l'hydrolyse des fonctions esters de la forme AM relâchant dans le cytoplasme une forme polyanionique appelée CCF2. Une fois la forme AM éliminée, le CCF2 reste enfermé dans la cellule à cause de ses charges anioniques. Ce substrat utilise les propriétés du FRET (section 1.4.2) et consiste en deux fluorophores, un de type coumarin et l'autre de type fluorescéine, reliés par un cycle β-lactam (illustré à la figure #12B). Le premier fluorophore agit à titre de donneur d'énergie, et le second, à titre d'accepteur. Lorsque le substrat n'est pas clivé par l'action de la β-lactamase, l'excitation du donneur (coumarin) par une lumière de longueur d'onde de 409 nm permet un transfert d'énergie, par le phénomène du FRET, à l'accepteur (fluorescéine) et une réémission de lumière verte à une longueur d'onde de 530 nm. Cependant, l'hydrolyse du substrat, catalysé par l'activité de la β-lactamase, sépare le donneur d'énergie (coumarin) de l'accepteur en libérant la fluorescéine. Le transfert d'énergie n'étant plus possible, le donneur, lorsque excité par la lumière à 409 nm émet maintenant une lumière bleue à 447 nm. La fluorescence de l'accepteur, quant à lui, est atténuer par le souffre libre (Zlokarnik *et al.*, 1998).

Figure #12 Représentation des structures chimiques des substrats utilisés dans la mise au point du PCA de la β-lactamase.

A- Hydrolyse de la nitrocéfine. Sous l'action de la β-lactamase, le substrat passe d'une couleur jaune à une couleur rouge qui peut-être analysée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 492 nm. **B-** Hydrolyse du CCF2-AM. Une fois entrée dans les cellules mammifères, la forme AM du substrat est transformée par les estérases cytoplasmiques de la cellule pour ne laisser que la forme CCF2. À cause des charges générées par cette transformation, le substrat modifié ne peut plus ressortir de la cellule et reste disponible pour l'action de la β-lactamase. Lorsque l'on stimule ce substrat non hydrolysé avec une lumière d'excitation de 409 nm, le donneur (coumarin) transfert, par un phénomène appelé FRET, son énergie d'émission à l'accepteur (fluorescéine) qui émet à une longueur d'onde verte correspondant à environ 520 nm. Par contre, lorsque le substrat est hydrolysé par l'action de la β-lactamase, le coumarin ne peut plus transférer sont énergie à la fluorescéine et émet donc une fluorescence de couleur bleue à une longueur d'onde d'environ 447 nm.


Nitrocefin
Jaune
COONa
NO2
NO2
Beta-Lactamase
COOH
COOH
NO2
NO2
Hydrolysée
Rouge
492 nm


CCF2-AM
Estérases cytoplasmiques
409 nm
520 nm
FRET
CCF2
Beta-Lactamase
409 nm
447 nm

1.6.DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE

Bien que le PCA *in vivo* de la DHFR soit un excellent essai pour l'étude des interactions protéine-protéine, le manque d'amplification de signal ainsi que le bruit de fond rencontré spécialement dans les souches cellulaires où l'on retrouve de la DHFR endogène sont problématiques. Ceci rend parfois la détection des interactions protéiques plus difficiles et plus laborieuses. Pour ces raisons, nous avons décidé de mettre au point un nouveau PCA utilisant la β-lactamase à titre d'enzyme rapporteuse. Cette enzyme permet de rencontrer toutes les exigences recherchées pour un nouveau PCA notamment l'amplification d'un signal, l'absence de bruit de fond peu importe la souche cellulaire ainsi que la possibilité de travailler *in vitro* et *in vivo*.

Le projet de recherche consista à mettre au point un essai afin d'étudier et d'analyser, *in vitro* et *in vivo* des interactions protéiques peu importe la souche cellulaire utilisée. Le projet comportait 3 étapes bien distinctes. Premièrement, il fallut bien analyser la structure de la β-lactamase afin de choisir un site de coupure favorable à la complémentation des deux fragments générés. Deuxièmement, une étude sommaire de permutation circulaire de l'enzyme ainsi qu'une expérience d'insertion d'un peptide de 15 acides aminés au site de coupure nous ont permis de déterminer si ce site de coupure est propice à la génération de fragments capables de se complémenter et de se replier. Finalement, nous avons utilisé des systèmes de dimérisation protéiques dans le but de vérifier si l'étude des interactions protéine-protéine est possible avec les fragments générés, et cela de manière *in vitro*, avec la nitrocéfine, et *in vivo*, avec le CCF2-AM. Deux systèmes ont été utilisés soit le système de protéines homodimériques de type fermeture éclair de leucines GCN4 (GCN4 leucine Zipper) et le système de dimérisation hétérodimérique de FKBP (FK506 binding protein) et domaine FRB (FKBP rapamycin binding domain). Grâce à l'utilisation de ces deux systèmes, nous avons pu déterminer si la complémentation des fragments de la β-lactamase est possible avec le site de coupure choisi.

CHAPITRE 2
MATÉRIELS ET MÉTHODES

CHAPITRE 2 -- MATÉRIELS ET MÉTHODES --

2.1. MATÉRIELS

2.1.1. Construction d'ADN

Les souches cellulaires bactériennes utilisées pour le sous-clonage des constructions d'ADN sont E. coli DH5-α ou Xl-1. Les enzymes de restriction KpnI, XhoI, HindIII et NotI ainsi que la T_4 DNA ligase, les déoxynucléotides proviennent de Fermentas. L'enzyme de restriction PstI ainsi que la Vent DNA polymérase proviennent de New England Biolabs. La nucléase Munc Bean provient de Pharmacia Amersham. Les amorces oligonucléotidiques sont le produit de Integrated DNA Technology. Le vecteur d'expression procaryote pQE32 provient de Qiagen tandis que le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1. (+) provient de Invitrogen. Le clone de Bcl-2 fut gracieusement donné par le Dr Stanley Korsmeyer.

2.1.2. Culture cellulaire et transfection

Les cellules eucaryotes HEK293 et COS-1 ont été gracieusement offertes par le laboratoire du Dr Guy Boileau. Les plaques, traîtées pour la culture cellulaire, de 6, 12 et 96 puits proviennent de Corning COStar (Cat.no: 3513). Le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS) et la Trypsin-EDTA sont de Life Technologies (Cat.no: 12100046, Cat.no: 253100062 et Cat.no: 21600069 respectivement). Le COSmic calf serum provient de Hyclone (Cat.no: SH3008703). Le réactif de transfection Fugene 6 est de Roche Diagnostics (Cat.no: 1814443).

2.1.3. Essai colorimétrique *in vitro*

La nitrocéfine provient de Becton Dickinson Microbiology Systems (Cat.no: 89-7065-0). Le DMSO (DiMéthylSulfOxide) provenant de Fischer Scientific (Cat.no: D128-500) est le véhicule pour la nitrocéfine. Le tampon phosphate de 100 mM à pH 7.4 a été fait au laboratoire à partir des réactifs provenant de ICN Biochemicals. L'appareil Perkin-Elmer HTS 7000 Series Bio Assay Plate Reader fut aimablement prêté par le laboratoire du Dr Jeffrey W. Keillor.

2.1.4. Essai fluorométrique et microscopie *in vivo*

Le substrat CCF2-AM a été gracieusement donné par le Dr Roger Tsien. Le tampon physiologique (Hepes 10 mM; sucrose 6 mM; glucose 10 mM; NaCl 140 mM; KCl 5 mM; $MgCl_2$ 2 mM; $CaCl_2$ 2 mM; pH 7.35) a été fait au laboratoire. Les plaques blanches de 96 puits proviennent de Dynex (Cat.no: 62402-980). Les lamelles de verre de 15 mm proviennent de Ted Pella Inc (Cat.no: 26021). Le microscope utilisé a été aimablement fourni par le Dr Louis-Eric Trudeau du département de pharmacologie. Il s'agit d'un microscope inversé Nikon Eclipse TE-200 avec un objectif plan fluor 40X sec, numériquement ouvert à 0.75. Les images sont prises avec une caméra CCD digitale refroidie à -50 °C de modèle Orca-II (Hamamatsu Photonics). La source de lumière est une lampe Xenon de modèle DG4 (Sutter Instruments). Les filtres d'émission peuvent être changés avec un changeur de filtre d'émission de modèle Quantoscope (Stanford Photonics). Les images sont visualisées par le programme ISee (Inovision Corporation) sur un ordinateur Silicon Graphics O_2. Les filtres suivant ont été utilisés et ils proviennent tous de Chroma Technologies : filtre d'excitation : 405 nm (bande de passage de 20 nm); miroir dichroic : 425 nm DCLP; filtre d'émission #1 : 460 nm (bande de passage de 50 nm); filtre d'émission #2 : 515 nm (bande de passage de 20 nm).

2.2. MÉTHODES

2.2.1. Construction d'ADN

2.2.1.1. Permutation circulaire, insertion de 15 acides aminés, et clonage de l'enzyme β-lactamaseΔ.

La première étape consista à enlever le site HindIII présent au niveau du site de multiclonage de pcDNA3.1(+). Ce site étant nécessaire au sous-clonage des protéines d'intérêts. Nous avons donc coupé pcDNA3.1(+) avec l'enzyme HindIII pour ensuite enlever ce site par l'action de la nucléase de la fève Munc qui coupe l'ADN simple brin dans la direction 5' -- 3' générant ainsi des bouts cohésifs. Ensuite nous avons lié le tout grâce à la T4 DNA ligase. Ce vecteur reçu le nom de pcDNA3.1.1..

De façon générale, toutes les constructions d'ADN ont été générées selon l'ordre suivant d'enzyme de restriction (en gras) dans pcDNA3.1.1. : **KpnI**-Protéine d'intérêt A ou un fragment de la β-lactamase-**HindIII**-*espaceur de 15 acides aminés* $(Gly.Gly.Gly.Gly.Ser.)_3$-**NotI**-Protéine d'intérêt B ou un fragment de la β-lactamase-**XhoI**. Pour l'insertion de 15 acides aminés, les fragments de la β-lactamase ont été maintenus dans l'ordre et séparés par les 15 acides aminés. Tandis que pour la permutation circulaire, les fragments ont été inversés et séparés par l'espaceur de 15 acides aminés. Les fragments de la β-lactamase (BLF[1] et BLF[2]) ont été générés par PCR à partir du gène de résistance à l'ampicillin amp^r présent sur le vecteur pQE32 (Qiagen). Les amorces suivantes ont été utilisées pour le fragment [1] : amorce en 5' KpnIATGBLF[1] : 5'-AAAAAAGGTACCATGCACCCAGAAACGCTGGT-3'; amorce en 3' BLF[1]HindIII: 5'-AAAAAAAAGCTTGCCAGTTAATAGTTTGCG-3'; amorce en 5' NotIBLF[1]: 5'-AAAAAAGCGGCCGCACACCCAGAAACGCTGGT-3'; amorce en 3' BLF[1] codonstopXhoI : 5'-AAAAAACTCGAGTTAGCCAGTTAATAGTTTGCG-3'. Les amorces suivantes ont été utilisées pour le fragment [2] : amorce en 5' KpnIATGBLF[2]:

5'-AAAAAAGGTACCATGCTACTTACTCTAGCTTCCC-3'; amorce en 3' BLF[2]HindIII : 5'-AAAAAAAAGCTTCCAATGCTTAATCAGTGAG-3'; amorce en 5' NotIBLF[2]: 5'-AAAAAAGCGGCCGCACTACTTACTCTAGCTTCCC-3'; amorce en 3' BLF[2]CodonStopXhoI : 5'-AAAAAACTCGAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG-3'. Ces produits de PCR ont été placés en amont ou en aval d'un espaceur de 15 acides aminés présent chez la construction EpoR-15a.a.-DHFR dans pREP7. Ces constructions ont ensuite été transférées par digestion KpnI/XhoI suivie d'une ligation avec T4 DNA ligase dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1.1.. L'enzyme de type sauvage (sans son peptide signal de 23 acides aminés) a aussi été clonée dans pcDNA3.1.1. en utilisant par contre les enzymes de restrictions PstI et XhoI. Les constructions suivantes ont ainsi été générées pcDNA3.1.1.-BLF[1]-15a.a.-BLF[2] évoquant l'insertion de 15 acides aminés au niveau de la boucle ϕ, pcDNA3.1.1.-BLF[2]-15a.a.-BLF[1] représentant la permutation circulaire et pcDNA3.1.1.-β-lactamaseΔ représentant l'enzyme β-lactamase de type sauvage mais tronquée du peptide signal. Toutes les constructions ont été séquencées pour en vérifier le bon cadre de lecture.

2.2.1.2. Construction du système de zipper de leucine GCN4

Les produits de PCR des fragments générés à l'étape précédente ont été placés en amont ou en aval de l'espaceur de 15 acides aminés étant lui devant ou après un zipper de leucine GCN4. Ces constructions avaient préalablement été conçues par le laboratoire dans pREP7. Une fois engendrées, ces constructions ont été transférées de pREP7 vers pcDNA3.1.1.. En résumé, les 4 clones suivants ont été formés : pcDNA3.1.1.-ZipGCN4-15aa-BLF[1], pcDNA3.1.1.-ZipGCN4-15aa-BLF[2], pcDNA3.1.1 BLF[1]-15aa-ZipGCN4, pcDNA3.1.1.-BLF[2]-15aa-ZipGCN4. Toutes ces constructions ont été séquencées pour en vérifier le bon cadre de lecture.

2.2.1.3. Construction du système de dimérisation de Bcl-2

Les produits de PCR de Bcl-2Δ ont été directement générés à partir du clone d'ADN de Bcl-2. La paire d'amorces suivantes a été utilisée pour placer Bcl-2Δ en amont de l'espaceur de 15 a.a. : amorce en 5' : KpnIATGBcl-2Δ : 5'-AAAAAG-

GGTACCATGGCGCACGCTGGGAGAACAG-3'; amorce en 3' Bcl2ΔHindIII : 5'-GGGGAAAAGCTTGCCGTACAGTTCCACAAAGG-3'. La paire d'amorces suivantes a été utilisée pour introduire Bcl2Δ en aval de l'espaceur de 15 a.a. : amorce en 5' : NotIBcl2Δ : 5'-AAAAAAAAAGCGGCCGCAATGGCGCACGCTGGGAGAACAG-3'; amorce en 3' Bcl2ΔcodonstopXhoI : 5'-GGAAAACTCGAGGCCGT-ACAGTTCCACAAAGG-3'. En résumé, les 4 clones suivants ont été formés : pcDNA3.1.1.-Bcl2Δ-15aa-BLF[1], pcDNA3.1.1.-Bcl2Δ-15aa-BLF[2], pcDNA3.1.1 BLF[1]-15aa-Bcl2Δ, pcDNA3.1.1.-BLF[2]-15aa-Bcl2Δ. Toutes ces constructions ont été séquencées pour en vérifier le bon cadre de lecture.

2.2.1.4. Construction du système FKBP/domaine FRB (TOR)

Les produits de PCR de FKBP et du domaine FRB (TOR) ont été générés à partir de constructions (pREP7-FKBP-10aa-DHFR[1,2] et pREP7-TOR-10aa-DHFR[3]) déjà présentes dans le laboratoire. La paire d'amorces suivantes a été utilisée pour situer FKBP en amont de l'espaceur de 15 a.a. : amorce en 5' : KpnIATGFKBP : 5'-AAAAGGGGTACCATGGGAGTGCAGGTGGAAAC-3'; amorce en 3' FKBPHindIII : 5'-AAAAAAAAGCTTTTCCAGTTTTAGAAGCTCC-3'. La paire d'amorces suivantes a été utilisée pour localiser FKBP en aval de l'espaceur de 15 a.a. : amorce en 5' NotIFKBP : 5'-AAAAGCGGCCGCAGGAGTGCAGGTGGAAAC-3'; amorce en 3' FKBPcodonstopXhoI : 5'-AAAAAACTCGAGTTATTCCAGTTTTAGAAGCTCC-3'. Les amorces suivantes ont été utilisées pour situer le domaine FRB (TOR) en amont de l'espaceur de 15 a.a. : amorce en 5' : KpnIATGTOR : 5'-AAAAAAGGTACCATG-GCGGTGCTTTGGCATG-3'; amorce en 3' : TORHindIII : 5'-AAAAAAAAGCTT-ACCAATTTTCCTGAAAACAT-3'. Ces produits de PCR ont été insérés aux endroits appropriés en remplacant les fragments de la _-lactamase dans les constructions pcDNA3.1.1. d'insertion et de permutation circulaire. En résumé, les 6 clones suivants ont été produits : pcDNA3.1.1.-FKBP-15aa-BLF[1], pcDNA3.1.1.-FKBP-15aa-BLF[2], pcDNA3.1.1 BLF[1]-15aa-FKBP, pcDNA3.1.1.-BLF[2]-15aa-FKBP, pcDNA3.1.1.-FRB-15aa-BLF[1] et pcDNA3.1.1.-FRB-15aa-BLF[2]. Toutes ces constructions ont été séquencées pour en vérifier le bon cadre de lecture.

2.2.2. Culture cellulaire et transfection

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules HEK293 ou COS-1 ont été ensemensées à une concentration de 1 X 10^5 cellules par puits dans une plaque de 12 puits avec du DMEM complet (contenant 100 mM L-glutamine, Streptomycine, pénicilline et 10% de sérum cosmic de veau). Un microgramme total d'ADN plasmidique a toujours été transfecté, que ce soit pour une transfection simple (un plasmide) ou pour une transfection double (deux plasmides) avec l'aide du réactif à transfection Fugène 6 (Roche Diagnostics) selon les instructions du manufacturier. Puis, 36 à 48 heures après la transfection, les cellules étaient recueillies pour un essai enzymatique *in vivo* ou *in vitro*.

2.2.3. Essai colorimétrique *in vitro*

Ce test fut adapté de l'essai d'activité de la β-galactosidase provenant de Sambrook *et al.*, 1989. Les cellules COS-1 ou HEK293 sont transfectées dans une plaque à 12 puits tel que memtionné à la section 2.2.2. Le jour de l'essai enzymatique, soit 36 à 48 heures post-transfection, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS froid (Life Technology) afin de retirer toute trace de millieu de culture. Ensuite les cellules sont recueillies en grattant le fond de chaque puits avec l'aide d'un policeman et resuspendues dans 300 μl de PBS froid. Chaque échantillon est gardé sur la glace. Les cellules sont ensuite culottées par 30 secondes de centrifugation à 4 °C. Le surnageant est éliminé et les cellules sont ensuite resuspendues dans 100 μl de tampon phosphate 100 mM pH 7.4 froid (tampon de réaction de la β-lactamase). Les parois cellulaires sont ensuites brisées par 3 cycles de gel-dégel (en gelant les cellules dans un bain d'éthanol/glace sèche pendant 10 minutes et en dégellant dans un bain à 37 °C pour 10 minutes). Les membranes ainsi que les débris cellulaires sont retirés avec 5 minutes de centrifugation (10000 x g) à 4°C. Le surnageant du lysat cellulaire est ensuite recueilli et entreposé à -20°C jusqu'à ce que l'essai soit effectué. L'essai s'effectue dans des plaques à 96 puits (Corning Costar). Chaque extrait cellulaire est d'abord déposer à raison de 20 μl dans chacun de leurs puits respectifs. Ensuite le mélange de 180 µl [100 μl tampon phosphate 100 mM pH 7.4 (concentration finale 60

mM); 79 μl H_2O; et 1 μl nitrocéfine 20 mM (Becton Dickenson Microbiology System) (concentration finale 100 μM)] est ajouté afin de démarrer la réaction. Le DMSO sert de véhicule pour la nitrocéfine et n'influence pas la réaction si la concentration finale est maintenue sous 5 % (dans l'essai la concentration finale est de 0,5 %). Les réactions d'hydrolyse de la nitrocéfine par la β-lactamase sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque Perkin Elmer HTS 7000 Series Bio Assay Reader en mode d'absorption et un filtre de 492 nm.

2.2.4. Essai fluorométrique *in vivo*

2.2.4.1. Activité enzymatique

Les cellules COS-1 ou HEK293 sont transfectées dans une plaque à 12 puits tels que memtionné à la section 2.2.2. mais elles sont d'abord ensemensée à une concentration 8 X 10^4 cellules par puits afin de retrouver environ 50% de confluence le jour de la transfection. Il faut aussi retrouver environ 60 à 80 % de confuence le jour de l'ajout du CCF2-AM car c'est à ce niveau de confluence que le rendement de chargement est maximum. Trente-six à 48 heures suivant la transfection, les cellules sont d'abord lavées 2 fois avec du PBS (Life Technology) à la température de la pièce afin de retirer toute trace de sérum. Ce sérum peut contenir des hydrolases capables d'endommager le substrat (Tsien *et al.*, 1998). Les cellules sont ensuites chargées avec le substrat CCF2-AM (1 mM)[4] à une concentration finale de 1 μM dilué dans un tampon physiologique (Hepes 10 mM; sucrose 6 mM; glucose 10 mM; NaCl 140 mM; KCl 5 mM; $MgCl_2$ 2 mM; $CaCl_2$ 2 mM; pH 7.35). Le chargement se fait pendant 1 heure à température ambiante et à l'abris de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec le tampon physiologique. Elles sont resuspendues dans le tampon physiologique et 1 X 10^6 cellules sont aliquotées individuellement dans un puit d'une plaque blanche à 96 puits (Dynex). L'activité de la β-lactamase est ensuite mesurée via l'apparition de fluorescence bleue et ce, à l'aide du lecteur de plaque Perkin Elmer HTS 7000 Series Bio Assay Reader en mode de lecture de la

[4] Le CCF2-AM est d'abord dilué à une concentration de 1 mM avec du DMSO.

fluorescence par le dessus avec un filtre d'excitation de 409 nM et un filtre d'émission de 465 nm.

2.2.4.2. Microscopie de fluorescence

Les cellules COS-1 ou HEK293 sont transfectées dans une plaque à 12 puits tel que mentionné à la section 2.2.4.1. ; toutefois contre les cellules sont ensemensées sur des lamelles de verre de 15 mm (Ted Pella Inc). Les cellules sont chargées tel que mentionné à la section 2.2.4.1.. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec le tampon physiologique. Les lamelles sont observées grâce à un système de microscopie inversé (voir section 2.1.4.).

CHAPITRE 3
RÉSULTATS

CHAPITRE 3 -- RÉSULTATS --

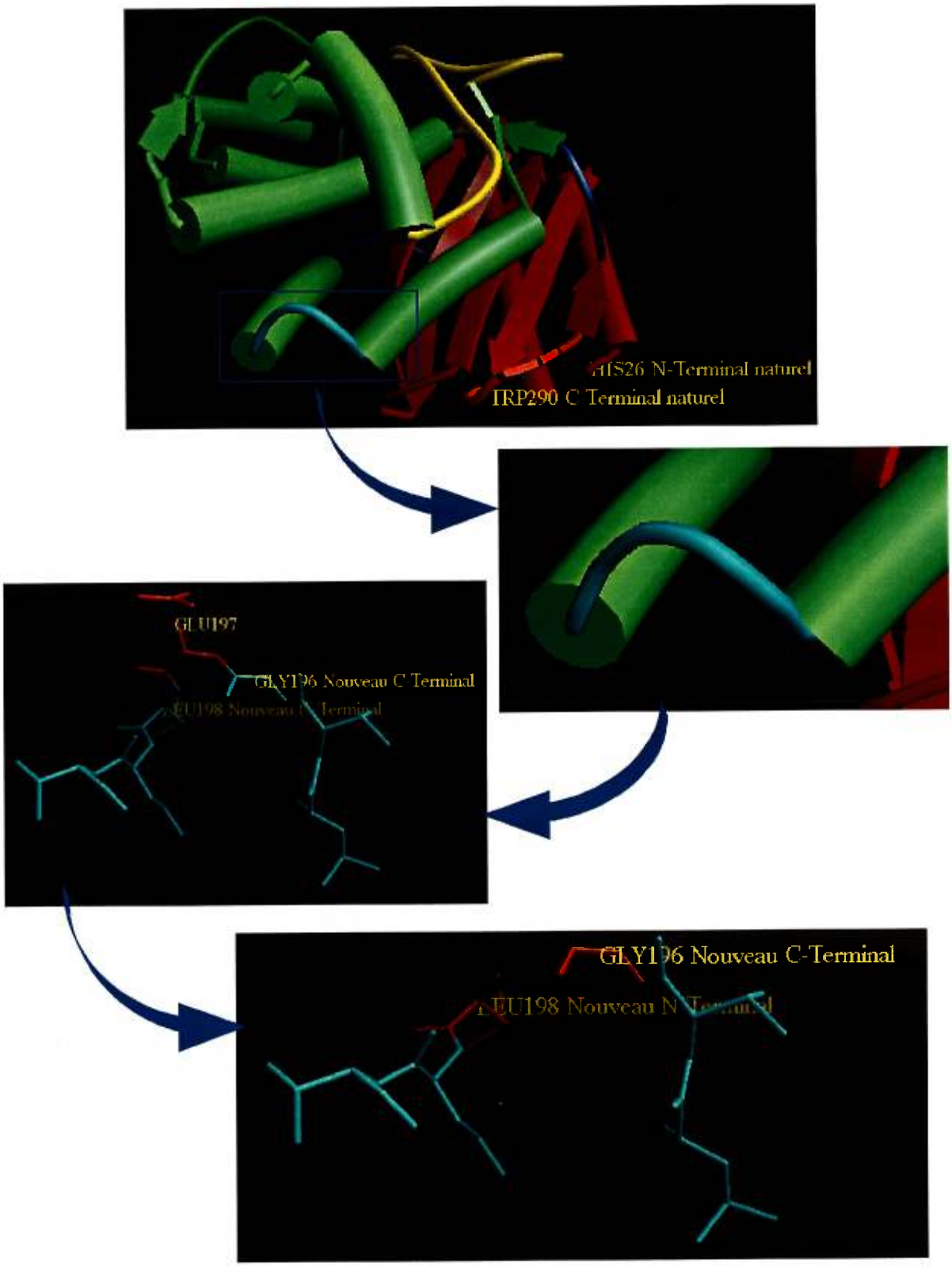
3.1.DESIGN DU PCA DE LA BÉTA-LACTAMASE

La détermination du site de coupure a une importance fondamentale afin que le nouveau PCA soit fonctionnel. Il faut sélectionner un endroit au niveau de la structure tri-dimensionnelle de la protéine où la fragmentation sera de faible influence notamment sur la qualité du réassemblement des fragments ainsi que le repliement de ceux-ci. Pour ce faire, une étude approfondie de la structure de la β-lactamase a été réalisée. Les prémices du choix d'un site de coupe ont aussi été suivi rigoureusement (section 1.4.1.). Puisque le site de coupure doit être situé à l'extérieur d'une hélice α ou d'un feuillet β afin de préserver au maximum la structure native de la protéine, la première étape a été de rechercher toutes les structures secondaires de type boucle chez la β-lactamase. Ensuite, afin de minimiser l'effet de la séparation des fragments sur l'activité rapporteuse de l'enzyme, nous avons éliminé toutes les boucles impliquées de près ou de loin avec le site actif. De plus, nous avons rejeté toutes celles qui interagissaient avec d'autres structures secondaires principalement par des ponts hydrogènes. Finalement, nous avons choisi une boucle située à peu près à la demie sur la structure primaire de la β-lactamase afin de générer des fragments de longueurs sensiblement semblables. De toutes les boucles considérées au début, une seule rencontra toutes les conditions pour constituer un bon site de coupure.

J'appelerai dorénavant cette boucle, la boucle ϕ (phi) pour sa représentation schématisant un cercle (la β-lactamase) entre-coupé d'une droite (site de coupure). Elle est constituée de 7 acides aminés (LEU^{194} à Thr^{200}) et constitue le lien entre deux hélices α du domaine α (figure #13B). Elle est dirigée vers l'extérieur de la structure globale de la protéine et postée complètement à l'opposé du site actif de cette dernière (figure #13A).

Figure #13 Étude de la localisation du site de coupure sur la structure cristallographique de la β-Lactamase TEM-1 à une résolution de 1,8 A .

A-B Représentation en structure secondaire de la boucle ϕ en cyan, en rapport avec la structure générale de la β-lactamase. **A-** La boucle ϕ est située entre 2 hélices α du domaine α (en vert) et à l'opposé du site actif, qui lui, est situé de l'autre côté de la boucle Ω (en jaune). À remarquer aussi, la position adjacente des extrémités N- et C-terminales naturelles de la protéine. **B-** Agrandissement de la boîte en A. **C-D** Représentation en bâtons des acides aminés impliqués au niveau de la boucle ϕ. **C-** Les nouvelles extrémités N- et C-terminales générées par les fragments sont indentifiées et l'acide glutamique 197 éliminé de la séquence est illustré en rouge. **D-** Les nouvelles extrémités N- et C-terminales générées par les fragments sont indentifiées et de couleur rouge. L'acide glutamique 197 est éliminé. Réalisé avec Weblab Viewlite 3.2. à partir du fichier PDB 1TEM.


HIS26 N-Terminal naturel
TRP290 C Terminal naturel
GLU197
GLY196 Nouveau C Terminal
LEU198 Nouveau N Terminal
GLY196 Nouveau C-Terminal
LEU198 Nouveau N Terminal

De plus, cette boucle sépare la protéine en deux fragments d'environ 170 et 100 acides aminés chacun, ce qui correspond assez bien au centre de la protéine.

En analysant plus précisément la boucle ϕ, on remarque qu'un seul acide aminé (Glu^{197}) possède une chaîne latérale qui pointe directement vers l'extérieur de la structure de la protéine. Cet acide glutamique est aussi le seul de la séquence qui ne permet pas de ponts hydrogènes avec d'autres structures de la β-lactamase. Il est, de plus, entouré majoritairement de résidus à chaine latérale hydrophobe capable de faire des interactions de types Van der Waals avec d'autres structures de la β-lactamase. Afin de bien séparer les fragments l'un de l'autre, nous avons décidé d'éliminer l'acide glutamique 197 (comparaisson entre les figures #13C et #13D). De plus, cette coupure au niveau de la boucle ϕ généra deux nouvelles régions N- et C-terminales soient respectivement Leu^{198} et Gly^{196} (Figure #13C et #13D).

Les fragments [1] et [2] de la β-lactamase ont été générés par PCR à partir du gène amp^r du plasmide commercial pQE-32 de Qiagen codant pour la résistance à l'ampicilline. BLF[1] (fragment [1] de la β-lactamase), qui représente la portion N-terminal de la β-lactamase, correspond précisément aux acides aminés 26 à 196, tandis que BLF[2] (fragment [2] de la β-lactamase), qui représente la portion C-terminal de la protéine, correspond aux résidus 198-290 de la protéine (figure #14). Dans le cas de BLF[1], nous avons éliminé les 23 premiers résidus de la protéine. Ces derniers codent pour le peptide signal permettant l'exportation de la protéine vers le périplasme chez les bactéries. Étant donné que nous ne connaissons pas l'incidence du peptide signal de la β-lactamase chez les cellules de mammifères, nous avons préféré l'éliminer. De plus, dans une étude par Zlokarnik *et al.*, où ils utilisèrent la β-lactamase à titre d'enzyme rapporteuse d'expression génique chez les eucaryotes, ces derniers éliminèrent le peptide signal de l'enzyme afin de récupérer l'enzyme fonctionnelle normalement présente au niveau du périplasme bactérien.

Figure #14 Présentation du site de coupure avec la séquence nucléotidique (5'-3') et protéique de l'isoforme TEM-1 de la β-lactamase.

Le peptide signal de 23 acides aminés qui a été éliminé de la séquence est en lettres blanches. Le fragment [1] de la β-lactamase (BLF[1]) est en lettres de couleur rouge et s'étend de His^{26} à Gly^{196} tandis que le fragment [2] (BLF[2]) est en lettres de couleur cyan et s'étend de la Leu^{198} jusqu'au codon stop. De nouvelles extrémités C- et N-terminales sont générées, illustrées en jaune, soit la Gly^{196} pour BLF[1] et Leu^{198} pour BLF[2]. L'acide glutamique 197 en vert, a été éliminé de la séquence.

ATG	AGT	ATT	CAA	CAT	TTC	CGT	GTC	GCC	CTT	ATT	CCC	TTT	TTT	GCG	GCA
M	S	I	Q	H	F	R	V	A	L	I	P	F	F	A	A
49/19															94/34
TTT	TGC	CTT	CCT	GTT	TTT	GCT	CAC	CCA	GAA	ACG	CTG	GTG	AAA	GTA	AAA
F	C	L	P	V	F	A	H	P	E	T	L	V	K	V	K
97/35															142/50
GAT	GCT	GAA	GAT	CAG	TTG	GGT	GCA	CGA	GTG	GGT	TAC	ATC	GAA	CTG	GAT
D	A	E	D	Q	L	G	A	R	V	G	Y	I	E	L	D
145/51															190/66
CTC	AAC	AGC	GGT	AAG	ATC	CTT	GAG	AGT	TTT	CGC	CCC	GAA	GAA	CGT	TTT
L	N	S	G	K	I	L	E	S	F	R	P	E	E	R	F
193/67															238/82
CCA	ATG	ATG	AGC	ACT	TTT	AAA	GTT	CTG	CTA	TGT	GGC	GCG	GTA	TTA	TCC
P	M	M	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L	S
241/83															286/98
CGT	ATT	GAC	GCC	GGG	CAA	GAG	CAA	CTC	GGT	CGC	CGC	ATA	CAC	TAT	TCT
R	I	D	A	G	Q	E	Q	L	G	R	R	I	H	Y	S
289/99															334/114
CAG	AAT	GAC	TTG	GTT	GAG	TAC	TCA	CCA	GTC	ACA	GAA	AAG	CAT	CTT	ACG
Q	N	D	L	V	E	Y	S	P	V	T	E	K	H	L	T
337/115															382/130
GAT	GGC	ATG	ACA	GTA	AGA	GAA	TTA	TGC	AGT	GCT	GCC	ATA	ACC	ATG	AGT
D	G	M	T	V	R	E	L	C	S	A	A	I	T	M	S
385/131															430/146
GAT	AAC	ACT	GCG	GCC	AAC	TTA	CTT	CTG	ACA	ACG	ATC	GGA	GGA	CCG	AAG
D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T	I	G	G	P	K
433/147															478/162
GAG	CTA	ACC	GCT	TTT	TTG	CAC	AAC	ATG	GGG	GAT	CAT	GTA	ACT	CGC	CTT
E	L	T	A	F	L	H	N	M	G	D	H	V	T	R	L
481/163															526/178
GAT	CGT	TGG	GAA	CCG	GAG	CTG	AAT	GAA	GCC	ATA	CCA	AAC	GAC	GAG	CGT
D	R	W	E	P	E	L	N	E	A	I	P	N	D	E	R
529/179															574/194
GAC	ACC	ACG	ATG	CCT	GTA	GCA	ATG	GCA	ACA	ACG	TTG	CGC	AAA	CTA	TTA
D	T	T	M	P	V	A	M	A	T	T	L	R	K	L	L
577/195															622/210
ACT	GGC	GAA	CTA	CTT	ACT	CTA	GCT	TCC	CGG	CAA	CAA	TTA	ATA	GAC	TGG
T	G	E	L	L	T	L	A	S	R	Q	Q	L	I	D	W
625/211															670/226
ATG	GAG	GCG	GAT	AAA	GTT	GCA	GGA	CCA	CTT	CTG	CGC	TCG	GCC	CTT	CCG
M	E	A	D	K	V	A	G	P	L	L	R	S	A	L	P
673/227															718/242
GCT	GGC	TGG	TTT	ATT	GCT	GAT	AAA	TCT	GGA	GCC	GGT	GAG	CGT	GGG	TCT
A	G	W	F	I	A	D	K	S	G	A	G	E	R	G	S
721/243															766/258
CGC	GGT	ATC	ATT	GCA	GCA	CTG	GGG	CCA	GAT	GGT	AAG	CCC	TCC	CGT	ATC
R	G	I	I	A	A	L	G	P	D	G	K	P	S	R	I
769/259															814/274
GTA	GTT	ATC	TAC	ACG	ACG	GGG	AGT	CAG	GCA	ACT	ATG	GAT	GAA	CGA	AAT
V	V	I	Y	T	T	G	S	Q	A	T	M	D	E	R	N
817/275													856/290		
AGA	CAG	ATC	GCT	GAG	ATA	GGT	GCC	TCA	CTG	ATT	AAG	CAT	TGG	TAA	
R	Q	I	A	E	I	G	A	S	L	I	K	H	W	*	

3.2. BRUIT DE FOND ENDOGÈNE

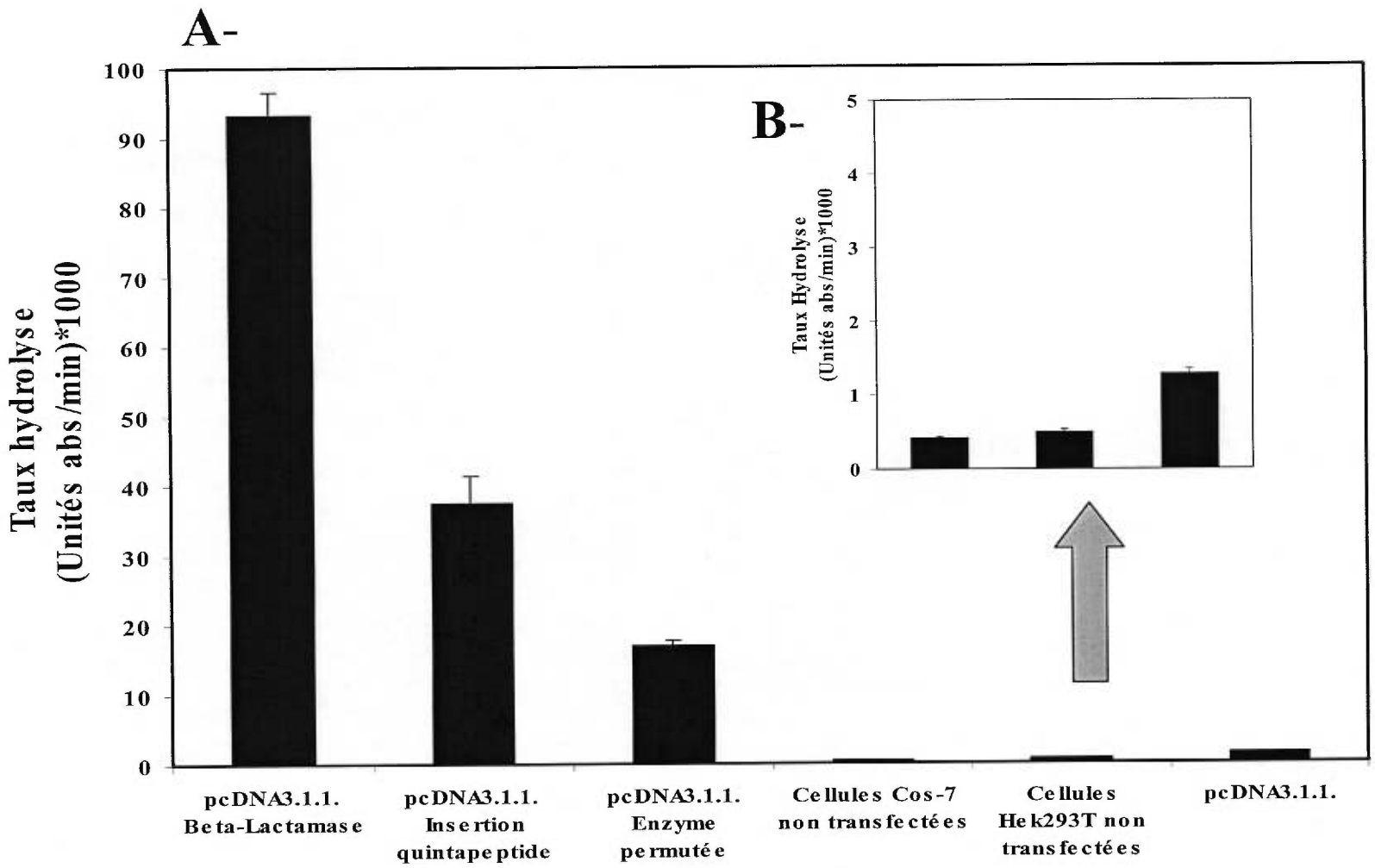
La première étape consiste à examiner la présence d'activité β-lactamase chez des cellules eucaryotes transfectées ou non avec le vecteur d'expression. En effet, l'existence d'une activité endogène, provenant des cellules ou de l'expression erronée du promoteur bactérien de la résistance à l'ampicilline (β-lactamase) du vecteur d'expression pcDNA3.1.1., pourrait constituer un bruit de fond gênant. Nous déterminerons ainsi si notre PCA est possible en cellules de mammifères sans la présence d'un bruit de fond parasitaire. Comme il l'est représenté à la figure #15A et #15B, en comparant des extraits cellulaires provenant de cellules transfectées avec la β-lactamaseΔ TEM-1 (94 unités abs/min) avec des extraits de cellules COS-1 ou HEK293 non transfectées (0,5 unités abs/min), il y a une augmentation moyenne de près de 200 fois l'activité endogène. À noter, le bruit de fond provenant des cellules est pratiquement inexistant à 0,5 unités abs/min. De plus, le bruit de fond est le même peu importe que l'on utilise des cellules COS-1 ou HEK293 (figure #15A et B, figure #18A). Lorsque les cellules sont transfectées avec le vecteur pcDNA3.1.1. sans insertion (vide), le taux d'hydrolyse de la nitrocéfine passe en moyenne de 0,5 unités abs/min à 1,28 unités abs/min gardant le bruit de fond des cellules transfectées avec le vecteur vide très bas en comparaison avec l'activité provenant de la β-lactamaseΔ TEM-1.

3.3. INSERTION QUINTAPEPTIDIQUE ET PERMUTATION CIRCULAIRE AU NIVEAU DE LA BOUCLE ϕ

Afin de vérifier si notre site de coupe est favorable au repliement et à la complémentation des fragments de la β-lactamase TEM-1, nous avons utilisé un espaceur de 15 acides aminés afin de créer un espace assez grand entre les deux fragments. Ces 15 acides aminés sont représentés par la séquence de 3 répétitions Gly-Gly-Gly-Gly-Sér.

Figure #15 Effet de la permutation de l'enzyme et de l'insertion pentapeptidique sur le taux d'hydrolyse de la nitrocéfine par la β-lactamaseΔ en comparaison avec le bruit de fond endogène.

A- Histogramme représentant les taux d'hydrolyse moyens de la nitrocéfine observés par les différents extraits cellulaires. Les cellules COS-1 ont été transfectées ou non avec 1 μg total d'ADN plasmidique correspondant à la construction testée. Afin de diluer l'activité de la β-lactamase, les cellules ont été resuspendues dans 200 μl de tampon phosphate au lieu de 100 μl. De plus, pour la même raison, seulement 4 μl de chaque extrait cellulaire ont été testés au lieu de 20 μl. Par contre, afin de vérifier le bruit de fond endogène des cellules de mammifère ou du vecteur pcDNA3.1.1., 20 μl d'extrait cellulaire non dilué (section 2.2.3) ont été testés. Les barres erreurs correspondent à trois expériences différentes. **B-** Réduction de l'échelle de gauche par 20x.


A-
B-
Taux hydrolyse
(Unités abs/min)*1000
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Taux Hydrolyse
(Unités abs/min)*1000
5
4
3
2
1
0
pcDNA3.1.1.
Beta-Lactamase
pcDNA3.1.1.
Insertion
quintapeptide
pcDNA3.1.1.
Enzyme
permutée
Cellules Cos-7
non transfectées
Cellules
Hek293T non
transfectées
pcDNA3.1.1.

Cette séquence ne forme aucune structure secondaire tout en restant particulièrement lâche et libre en solution. Nous avons procédé à deux expériences afin de déterminer si le site de coupure choisi pouvait permettre la reconstitution et le repliement des fragments de la β-lactamaseΔ: une expérience d'insertion quintapeptidique directement au niveau de la boucle ϕ ainsi qu'une permutation circulaire de l'enzyme. Ces deux expériences impliquent de profonds changements au niveau de la topologie de l'enzyme. Ces modifications nous permettront de bien analyser l'implication du site de coupure sur le repliement de l'enzyme.

L'insertion d'un quintapeptide a consisté à introduire l'espaceur de 15 acides aminés directement au site de coupe, soit entre les deux fragments de la β-lactamase, tout en gardant l'ordre de la séquence des fragments intact. Ainsi nous avons généré la séquence suivante BLF[1]-15a.a.-BLF[2] dans le vecteur pcDNA3.1.1. Selon la figure #15A, une mutation via l'insertion d'un peptide de 15 acides aminés directement au niveau de la boucle ϕ entraîne une diminution de l'activité de la β-lactamase. En effet, comme il l'est représenté à la figure #15A, les taux d'hydrolyse de la nitrocéfine par les extrait cellulaires de cellules COS-1 exprimant BLF[1]-15a.a.-BLF[2] est d'environ 38 unités abs/min alors que les extraits impliquant l'enzyme de type sauvage garde un taux d'environ 94 unités abs/min. Cela correspond à une diminution d'activité d'environ 60%.

La seconde expérience consiste à permuter les régions N- et C-terminal en insérant le nouveau site de coupe, c'est ce que l'on appelle la permutation circulaire. Chez une protéine permutée, les extrémités N- et C-terminales naturelles de la chaîne polypeptidique de type sauvage sont liées par un espaceur et de nouvelles régions N- et C-terminales sont générées via un site de coupe. Chez la β-lactamase TEM-1, les extrémités N- et C-terminales naturelles sont adjacentes l'une de l'autre et éloignées du site actif (représenté à la figure #13A). Nous avons donc joint ces deux extrémités par l'espaceur de 15 acides aminés en inversant les deux fragments dans l'ordre de la structure primaire normale. Ainsi nous avons généré la construction suivante BLF[2]-15a.a.-BLF[1]. L'enzyme permutée exprimée chez des cellules COS-1, montre un taux d'hydrolyse de la nitrocéfine de 18 unités abs/min correspondant à une diminution de 80 % l'activité normalement retrouvée chez des extraits de cellules exprimant l'enzyme β-lactamaseΔ TEM-1.

3.4.SYSTÈME DE DIMÉRISATION DES ZIPPERS DE LEUCINE GCN4

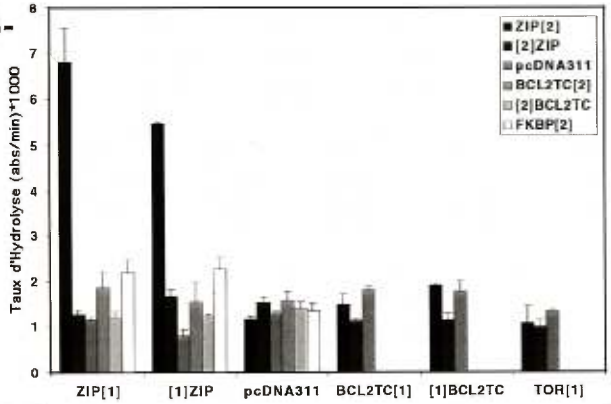
3.4.1. Analyse *in vitro*

Le premier système utilisé pour étudier la complémentation de la β-lactamase est celui des zippers de leucine GCN4. Ce système est très utilisé dans le laboratoire afin de mettre au point les nouveaux PCA. Il s'agit d'un système homodimérique consistant en un peptide de 31 acides aminés de long avec une répétition de leucine à tous les 7 acides aminés. Cette répétition de leucine confère un côté hydrophobe au peptide lui permettant de dimériser avec un autre peptide possédant la même structure (représenté à la figure #16A). Ce peptide GCN4 a été placé en amont ou en aval de chacun des fragments de la β-lactamase et séparé par l'espaceur de 15 acides aminés dans tous les cas. Quatre orientations ont ainsi été testées : ZipGCN4BLF[1] vs ZipGCN4BLF[2]; ZipGCN4BLF[1] vs BLF[2]ZipGCN4; BLF[1]ZipGCN4 vs ZipGCN4BLF[2] et BLF[1]ZipGCN4 vs BLF[2]ZipGCN4. De plus, chaque fusion a été testée en co-transfection avec le vecteur pcDNA3.1.1 vide pour vérifier l'activité intrinsèque des fragments. De plus, dans le but de vérifier si un réassemblement spontané des fragments est possible, c'est à dire un réassemblement non assisté, nous avons utilisé trois contrôles négatifs dont les interfaces de dimérisation sont incapable d'interagir avec les zippers de leucine GCN4. L'étude complète du système de dimérisation homodimérique des zippers de leucine GCN4 est présentée à la figure #16B. Chaque fusion est aussi représentée afin de bien distinguer l'implication de chacun des fragments au niveau de la complémentation ainsi que les orientations où le PCA de la β-lactamase est le plus efficace. (figure #16-C à F).

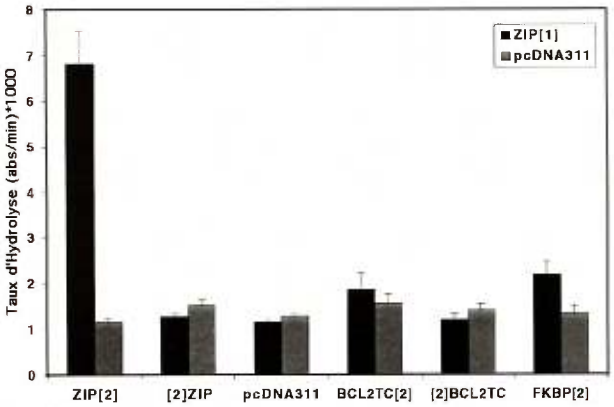
Figure #16 Étude *in vitro* de la complémentation des fragments de la β-lactamase par le système de dimérisation homodimèrique des zippers de leucine GCN4

Taux d'hydrolyse de la nitrocéfine observé par la complémentation des fragments de la β-lactamase chez des extraits de cellules COS-1. Les cellules ont été transfectées avec un total de 1 μg d'ADN plasmidique en transfection double. Les extraits cellulaires ont été testés comme mentionné à la section 2.2.3.. Les barres erreurs correspondent à 3 expériences différentes. **A-** Représentation cristallographique des structures secondaires du système de dimérisation des zippers de leucine GCN4. Les leucines importantes à la dimérisation du système sont en format CPK. Réalisé avec Weblab Viewlite 3.2. à partir du fichier PDB 2ZTA. **B-** Histogramme représentant l'étude complète du système de dimérisation des zippers de leucine GCN4. **C et D-** Analyse de l'implication du fragment [1] de la β-lactamase sur la complémentation lorsque ce dernier est positionné en C-terminal **(C)** ou en N-terminal **(D)** des fusions protéiques. **E et F-** Analyse de l'implication du fragment [2] de la β-lactamase sur la complémentation lorsque ce dernier est positionné en région C-terminal **(E)** ou N-terminal **(F)** des fusions protéiques.

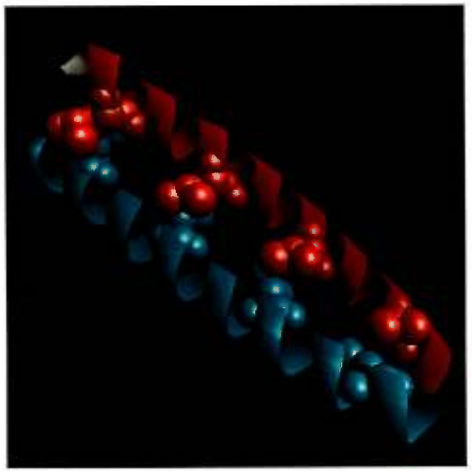
B-


Taux d'Hydrolyse (abs/min)*1 000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
ZIP[2]
[2]ZIP
pcDNA311
BCL2TC[2]
[2]BCL2TC
FKBP[2]
ZIP[1]
[1]ZIP
pcDNA311
BCL2TC[1]
[1]BCL2TC
TOR[1]

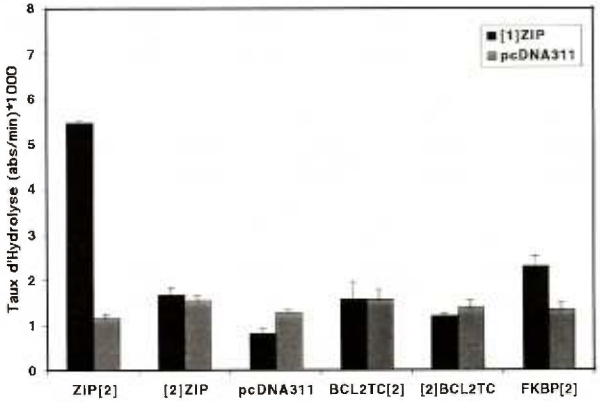
C-


Taux d'Hydrolyse (abs/min)*1 000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
ZIP[1]
pcDNA311
ZIP[2]
[2]ZIP
pcDNA311
BCL2TC[2]
[2]BCL2TC
FKBP[2]

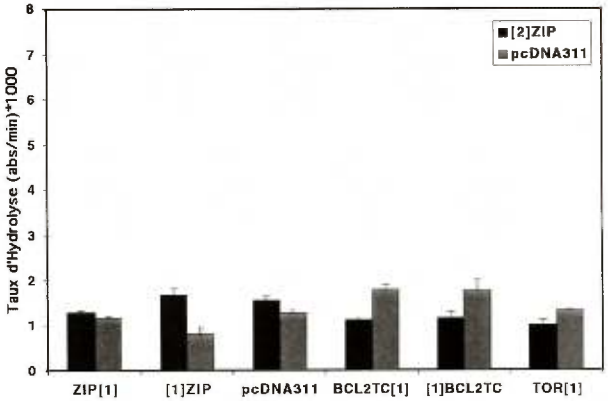
A-



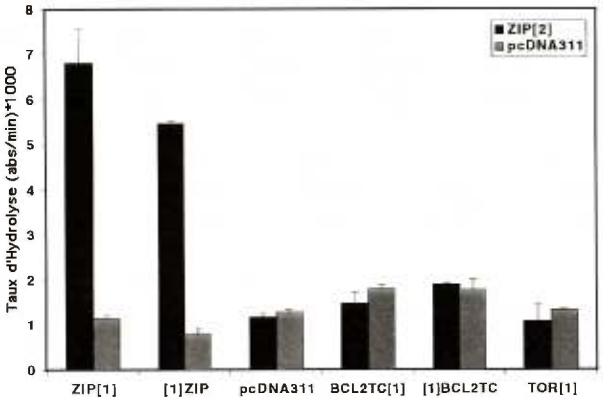
D-


Taux d'Hydrolyse (abs/min)*1 000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
[1]ZIP
pcDNA311
ZIP[2]
[2]ZIP
pcDNA311
BCL2TC[2]
[2]BCL2TC
FKBP[2]

E-


Taux d'Hydrolyse (abs/min)*1 000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
[2]ZIP
pcDNA311
ZIP[1]
[1]ZIP
pcDNA311
BCL2TC[1]
[1]BCL2TC
TOR[1]

F-


Taux d'Hydrolyse (abs/min)*1 000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
ZIP[2]
pcDNA311
ZIP[1]
[1]ZIP
pcDNA311
BCL2TC[1]
[1]BCL2TC
TOR[1]

Si l'on considère les fusions ZipGCN4BLF[1] (figure #16C) et BLF[1]ZipGCN4, représentant le fragment [1] de la β-lactamase positionné respectivement en C- ou en N-terminal des fusions protéiques. Les extraits cellulaires de cellules COS-1 ayant été transfectées avec ces fusions en combinaison ZipGCN4BLF[2] montre un taux d'hydrolyse de la nitrocéfine de 6,9 unités abs/min. Cette activité est attribuable à la complémentation des fragments de la β-lactamase. Par contre, lorsque ZipGCN4BLF[1] et BLF[1]ZipGCN4 est co-exprimé BLF[2]ZipGCN4, nous observons un rendement d'hydrolyse de la nitrocéfine égal à celui de cellules transfectées avec le vecteur seul. Ici la complémentation des fragments n'a pas lieu puisqu'aucune activité de la β-lactamase ne peut-être détectée. Le rendement du fragment [1] en position C- ou N-terminal de la fusion, co-exprimé avec pcDNA3.1.1. vide, est celui retrouvé chez les cellules exprimants le vecteur vide.

Afin de vérifier si un réassemblement spontané du fragment [1] en position C-ou N-terminal avec le fragment [2] qu'il soit en position C- ou N-terminal est possible, nous avons co-exprimé ZipGCN4BLF[1] ou BLF[1]ZipGCN4 avec 3 contrôles négatifs dont nous savons que les interfaces de dimérisation sont incompatibles. Ces contrôles négatifs sont les fusions protéiques du fragment [2] avec la protéine Bcl-2 et FKBP. Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique appartenant à la famille des protéines Bcl-2. Cette protéine est capable de s'homo ou de s'hétérodimériser avec d'autres membres de cette famille. Normalement cette protéine est associée à la membrane de la mitochondrie via sa région C-terminale. Lorsque nous effectuons les essais *in vitro,* les membranes, les noyaux ainsi que la majorité des organelles incluant les mitochondries sont éliminés des extraits cellulaires recueillis. Afin de maintenir la fusion protéique de Bcl-2 avec les fragments [1] et [2] présents chez les extraits cellulaires, nous avons procédé à l'élimination de cette région d'encrage correspondant aux 36 derniers acides aminés de la protéine Bcl-2 (Borner *et al.*, 1994). La délétion de cette région ne change pas la structure globale de la protéine puisque celle-ci est toujours capable de dimériser avec elle-même et d'autres membres de la famille de protéine Bcl-2 tout en étant capable aussi de médier son activité anti-apoptotique (Borner *et al.*, 1994). Les fusions Bcl-2ΔBLF[1], Bcl-2ΔBLF[2], BLF[1]Bcl-2Δ et BLF[2]Bcl-2Δ ont été générées afin de servir de contrôle négatif pour vérifier le réassemblement non assisté des fragments de la β-lactamase. Lorsque les fusions ZipGCN4BLF[1] (figure #16C) ou BLF[1]ZipGCN4 (figure #16D) sont co-exprimées avec

Bcl-2ΔBLF[2] ou BLF[2]Bcl-2Δ, il n'y a aucune augmentation des taux d'hydrolyse de la nitrocéfine par rapport a ceux observés en co-expression avec pcDNA3.1.1. vide. Par contre, lorsque ZipGCN4BLF[1] ou BLF[1]ZipGCN4 sont mis en présence de FKBPBLF[2], une fusion protéique appartenant au système de dimérisation FRBP/domaine FRB (section 3.3.5), on observe une légère augmentation du taux d'hydrolyse de la nitrocéfine (figure #16C et D, comparaison ZipGCN4BLF[1], BLF[1]ZipGCN4 et pcDNA3.1.1. en combinaison avec la fusion FKBP[2]). Ceci laisse suggérer, qu'il pourrait exister une interaction faible entre les zippers de leucine GCN4 et la protéine FKBP.

Si on examine le fragment [2] en position C-terminal des fusions protéiques de zippers de leucine GCN4 (figure #16F). Lorsque celui-ci est co-exprimé avec ZipGCN4BLF[1] ou BLF[1]ZipGCN4, nous observons une augmentation significative du taux d'hydrolyse de la nitrocéfine provenant des extraits cellulaires. Par contre, lorsque ZipGCN4BLF[2] est mis en présence du fragment [1] quand celui-ci est fusionné à Bcl-2Δ en position N- ou en C-terminale de la construction, aucune augmentation du taux d'hydrolyse de la nitrocéfine ne peut-être observé. De même, lorsque ZipGCN4BLF[2] est mis en présence de FRBBLF[1], une fusion protéique appartenant au système de dimérisation FKBP et le domaine FRB, aucune augmentation n'est remarquée.

Lorsque le fragment [2] est en position N-terminale de la fusion protéique du système des zippers de leucine GCN4, aucune augmentation d'activité de la β-lactamase ne peut être observée peu importe que le fragment [1] soit en position N- ou C-terminale de la fusion (figure #16E).

3.4.2. Analyse *in vivo*

Nous avons aussi procédé à l'étude *in vivo* du système de dimérisation des zippers de leucine GCN4. Comme le montre la figure #17 et #18, il est possible de mesurer et de visualiser l'apparition de fluorescence bleue directement avec le substrat CCF2-AM chez des cellules entières.

Figure #17 Étude *in vivo* de la complémentation des fragments de la β-lactamase par le système de dimérisation homodimèrique des zippers de leucine GCN4

Taux d'hydrolyse du CCF2-AM observé par la complémentation des fragments de la β-lactamase chez des cellules HEK293. Les cellules ont été transfectées avec un total de 1 μg d'ADN plasmidique en transfection double. Elles ont été analysées pour une apparition de fluorescence bleue à 460 nm comme mentioné à la section 2.2.4.. Les barres erreurs correspondent à 3 expériences différentes.

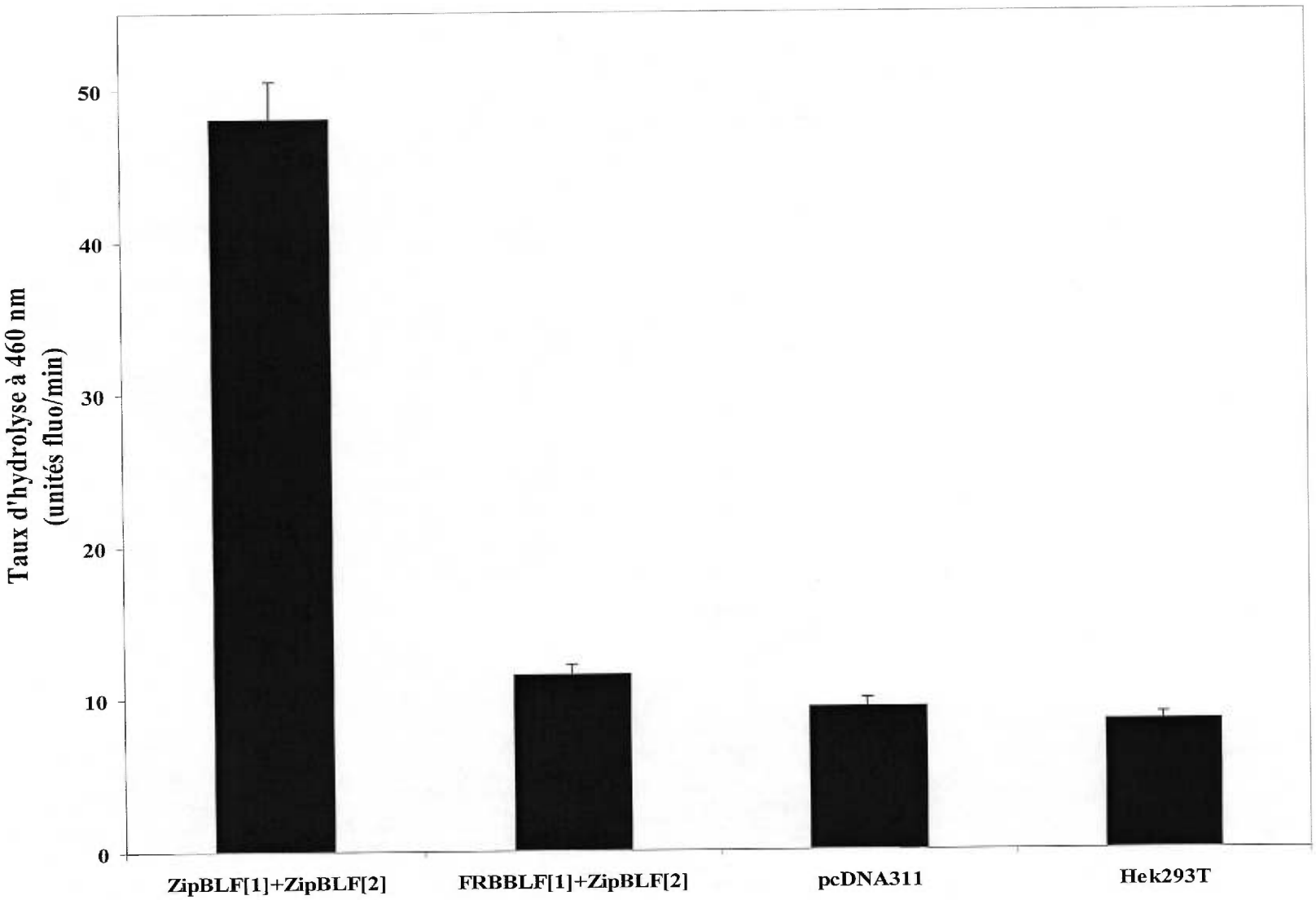
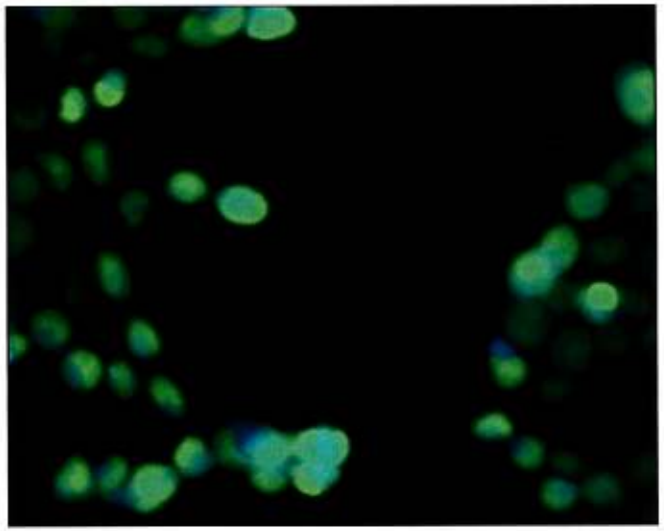

Taux d'hydrolyse à 460 nm
(unités fluo/min)
50
40
30
20
10
0
ZipBLF[1]+ZipBLF[2]
FRBBLF[1]+ZipBLF[2]
pcDNA311
Hek293T

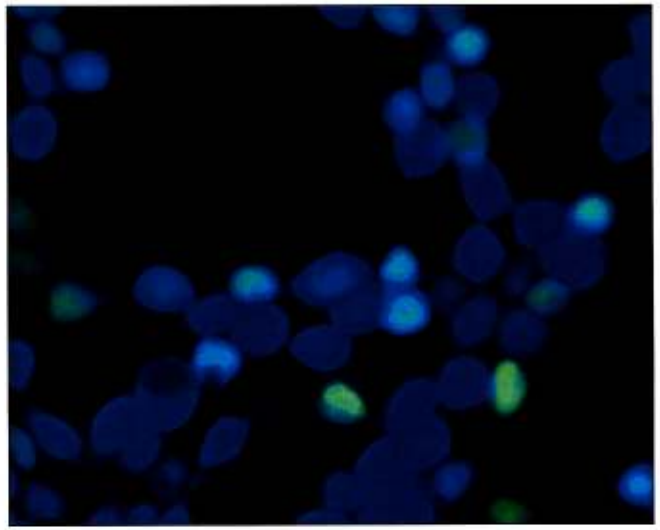
Figure #18 Microscopie de fluorescence du système de dimérisation homodimérique des zippers de leucine GCN4

Microscopie de fluorescence de cellules HEK293 transfectées avec un total de 1 μg d'ADN plasmidique en simple ou en double transfection. Visualisation réalisée comme il l'est mentionné à la section 2.2.4.2.. **A-** Cellules non transfectées. **B-** Cellules exprimant la β-lactamaseΔ. **C-** Cellules exprimant FRB-BLF[1] et Zip-BLF[2]. **D-** Cellules exprimant Zip-BLF[1] et Zip-BLF[2].

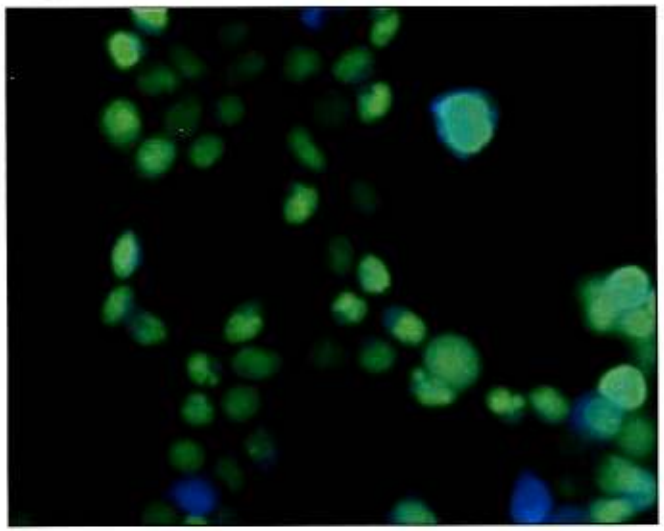
A-



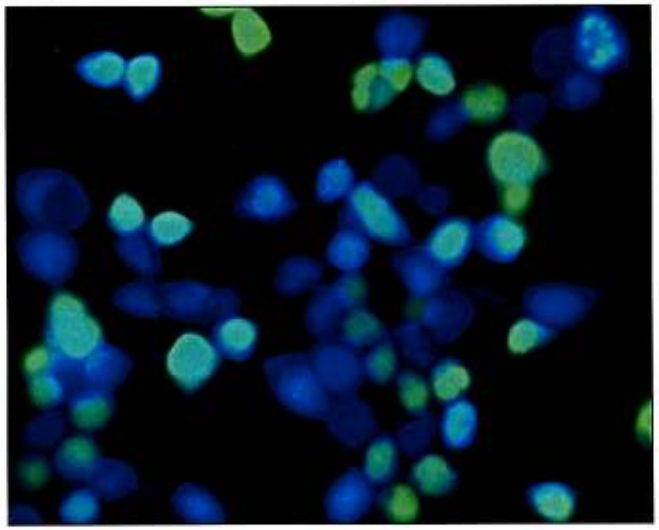
B-



C-



D-



Par contre étant donné la faible quantité de substrat en notre possession, nous avons été limité pour le choix des contrôles. À la figure #17, nous retrouvons les taux d'hydrolyse correspondant à l'apparition de fluorescence bleue à 460 nm chez des cellules HEK293 et à la figure #18 nous retrouvons l'image photographique de ces mêmes cellules.

Lorsque les domaines d'oligomérisation sont compatibles (ZipGCN4BLF[1] + ZipGCN4BLF[2]), nous observons un taux d'hydrolyse par la complémentation des fragments de la β-lactamase de 48,2 unités fluo/min (figure #17). De plus, en microscopie de fluorescence, la majorité des cellules sont devenues bleues une fois transfectées avec les fusions correspondantes (figure #18D) comme c'est le cas avec le contrôle de la β-lactamaseΔ (figure #18B). D'autre part, lorsque l'interaction est impossible, par exemple avec les fusions FRBBLF[1] et ZipGCN4[2] (figure #17), le taux d'hydrolyse est de 11,2 unités fluo/min. Ceci est appuyé en microscopie avec l'obtention de cellules vertes (figure #18C). Le bruit de fond provenant des cellules (8,9 unités fluo/min) et/ou du plasmide vide (9,1 unités fluo/min) reste très bas en comparaison avec les résultats obtenus avec le PCA de la β-lactamase (figure #17). Il en est de même en microscopie où les cellules HEK293 montrent une fluorescence verte lorsqu'elles ne sont pas transfectées (figure #18A).

3.5.SYSTÈME DE DIMÉRISATION DE FKBP ET DU DOMAINE FRB

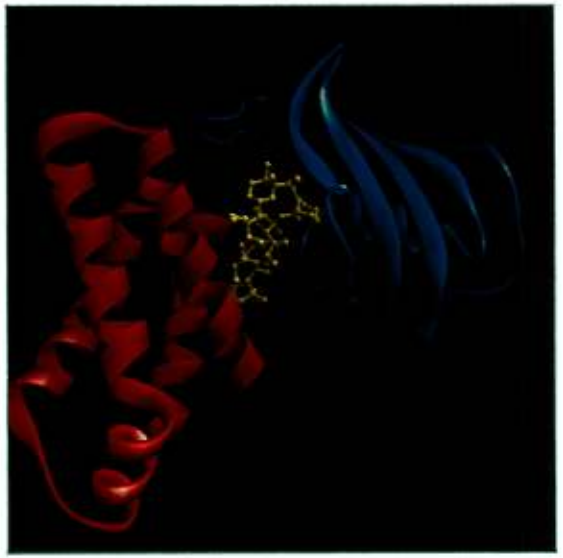
Comme second test de dimérisation, nous avons utilisé le système de dimérisation de FK506-binding protein (FKBP) avec sa cible, le domaine FKBP-rapamycin-binding (FRB) de FKBP12-rapamycin-associating-protein (FRAP). Il est possible d'induire l'interaction entre FKBP et le domaine FRB avec la rapamycine (figure #19A). Il est aussi possible de compétitionner cette interaction avec le FK506 qui s'associe seulement avec FKBP et sans lier le domaine FRB. Les fusions protéiques FRBBLF[1] et FKBPBLF[2] ont été exprimées dans des cellules COS-1 individuellement et ensuite testées ensembles avec la nitrocéfine. Comme le montre la figure #19C (■), nous avons induit la dimérisation des fusions protéiques via des doses croissantes de rapamycine. Chaque point sur la courbe correspond au taux d'hydrolyse de la nitrocéfine résultant de la complémentation des

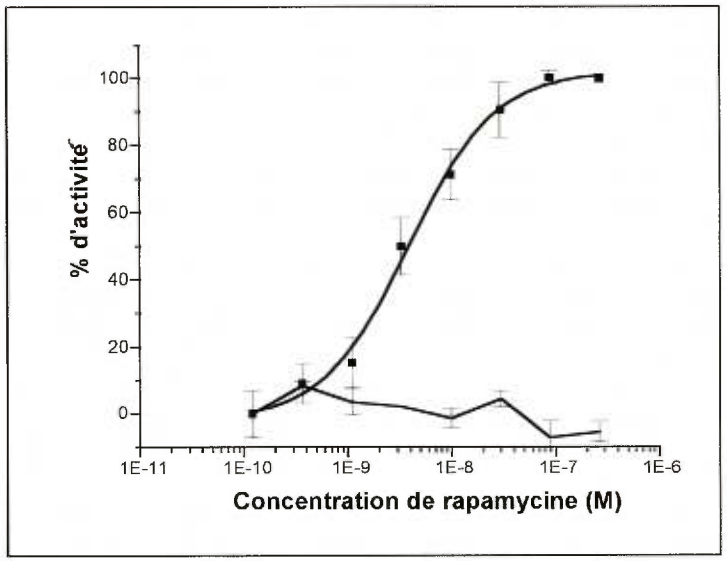
fragments de la β-lactamase et répondant à une concentration précise de rapamycine. La courbe concorde avec un EC_{50} de 4 nM. Afin de démontrer que la rapamycine n'induit pas la complémentation des fragments de la β-lactamase, nous avons vérifié les fusions FRBBLF[1] et ZipGCN4BLF[2] pour des doses croissantes de rapamycine. Comme le montre la figure #19C (○), la complémentation des fragments de la β-lactamase n'est pas induite par la rapamycine. Il est aussi possible de compétitionner l'interaction de la rapamycine avec le FK506 comme le montre la figure #19D (■). Ici 50 nM de rapamycine ont été is en compétition avec des doses croissantes de FK506. Chaque point sur la courbe correspond au taux d'hydrolyse de la nitrocéfine résultant de la complémentation des fragments de la β-lactamase et répondant à une concentration de 50 nM de rapamycine mais en compétition avec le FK506. La courbe convient avec un EC_{50}[6] de 450 nM.

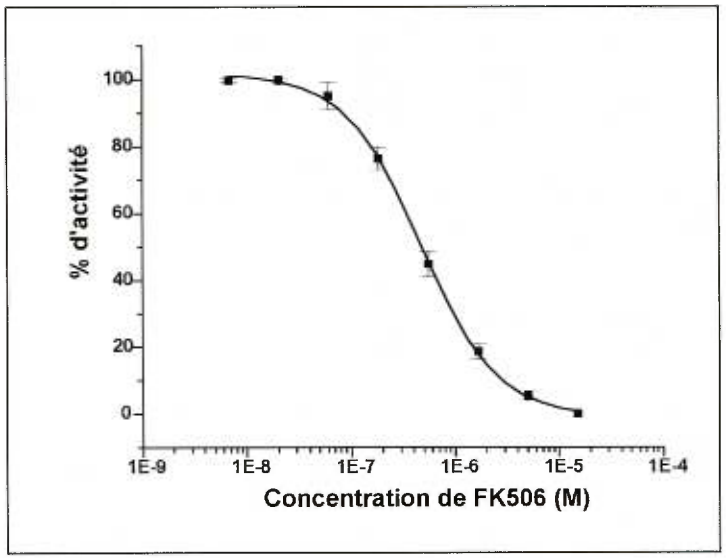
[6] Tout au long du document, EC_{50} prend la signification de concentration effectrice à 50% d'activité de la complémentation de la β-lactamase.

Figure #19 Étude *in vitro* de la complémentation des fragments de la β-lactamase par le système inductible de dimérisation hétérodimérique de FKBP et du domaine FRB

Taux d'hydrolyse de la nitrocéfine observé par la complémentation des fragments de la β-lactamase chez des extraits de cellules COS-1. Les cellules ont été transfectées avec un total de 1 μg d'ADN plasmidique en simple. Les extraits cellulaires ont été testés comme mentionné à la section 2.2.3. sauf que 20 μl de chacun des extraits ayant la fusion correspondante ont été mis en présence l'un de l'autre. Les barres erreurs correspondent à 3 expériences indépendantes pour chaque concentration de rapamycine ou de FK506. **A-** Représentation cristallographique des structures secondaires du système de dimérisation FKBP et le domaine FRB. La protéine FKBP est illustrée en rouge et le domaine FRB est de couleur bleue tandis que la rapamycine permettant la dimérisation est jaune. Réalisé avec Weblab Viewlite 3.2. à partir du fichier PDB 1FAP. **B-** Courbe dose-réponse d'extraits cellulaires de COS-1 pour des concentrations croissantes de rapamycine. FRB-15a.a.-BLF[1] + FKBP-15a.a.-BLF[2] (■) ou FRB-15a.a.-BLF[1] + ZipGCN4-15a.a.-BLF[2] (○). **C-** Courbe de compétition avec l'inhibiteur FK506, un analogue de la rapamycine.




% d'activité
100
80
60
40
20
0
1E-11
1E-10
1E-9
1E-8
1E-7
1E-6
Concentration de rapamycine (M)


% d'activité
100
80
60
40
20
0
1E-9
1E-8
1E-7
1E-6
1E-5
1E-4
Concentration de FK506 (M)

CHAPITRE 4
DISCUSSION

CHAPITRE 4 – DISCUSSION –

4.1. UN NOUVEL ESSAI DE COMPLÉMENTATION PROTÉIQUE

4.1.1. Bruit de fond

Nous avons choisi la β-lactamase à titre d'enzyme rapporteuse parce que celle-ci n'est pas retrouvée chez toutes les souches cellulaires mammifères diminuant ainsi grandement le bruit de fond endogène (Moore *et al.*, 1997). Comme le montre la figure #15B, #17 et #18A, le bruit de fond testé chez les extraits cellulaires de COS ou de HEK est resté très bas. Lorsque le vecteur pcDNA3.1.1. vide est exprimé chez ces mêmes cellules, nous remarquons une légère augmentation de l'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine par les extraits cellulaires. Cette élévation est probablement due à l'expression erronée du gène de résistance à l'ampicilline codant pour la β-lactamase. Ce gène est présent chez ce vecteur et sert au sous clonage d'ADN en cellule bactérienne. De plus, nous avons essayé plusieurs vecteurs d'expression chez la levure et certains d'entre-eux montrent énormément d'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine alors que la levure elle-même ne possède pas cette activité endogène (communication personnelle avec Geoffroi Denis) . Nous avons conclu que cette activité découle de la présence de la β-lactamase provenant de la résistance à l'ampicilline bactérienne. Par contre, chez les cellules de mammifères, l'augmentation de l'activité est minime en comparaison avec l'activité procurée avec la complémentation des fragments.

4.1.2. Choix du site de coupure

Nous avons procédée à deux expériences pour déterminer si le site de coupure choisi au niveau de la boucle ϕ est propice au repliement de l'enzyme ainsi qu'à la complémentation des fragments.

La première expérience consiste à insérer une séquence peptidique de 15 acides aminés directement au site de coupe entre les deux futurs fragments. De cette manière, nous pouvons générer un grand espace entre les fragments de la β-lactamase et en vérifier si l'activité enzymatique peut être conservée. Hallet *et al.* ont présenté, en 1997, des travaux de mutagenèse par insertion aléatoire de séquences pentapeptidiques au niveau de la séquence primaire de la β-lactamase TEM-1 (Hallet *et al.*, 1997). Ils montrèrent que sur les 23 sites d'insertion répertoriés et étudiés chez la protéine, 5 seulement pouvaient garder l'activité de la β-lactamase de type sauvage. Deux de ces 5 sites étaient situés exactement au niveau de la boucle β soient après Glu^{197} et après Leu^{198}. Les 3 autres sites d'insertion étaient, quant à eux, situés au niveau d'une autre boucle (Ile^{263} à Met^{272})[7]. Tel qu'illustré par Hallet *et al.*, l'insertion aléatoire de 5 acides aminés au niveau de la structure de la β-lactamase peut abolir partiellement ou complètement l'activité de l'enzyme (18 sites sur 23) (Hallet *et al.*, 1997). Par contre, lorsque ces insertions sont opérées à des endroits stratégiques qui affectent peu la structure globale de la protéine, en particulier le site actif, l'enzyme mutée garde en partie l'activité du type sauvage.

Après avoir inséré un espaceur de 15 acides aminés directement au site de coupure, soit au niveau de la boucle ϕ, nous avons observé une diminution de l'activité normalement retrouvée chez la β-lactamaseΔ. Malgré cette diminution, nous retrouvons toujours 40% de l'activité originale de la protéine de type sauvage. Cette rétention d'activité est élevée compte tenu que nous avons créé un écart important entre les deux futurs fragments. Cet écart étant 3 fois plus grand que celui imposé par Hallet *et al.* dans leurs travaux d'insertion aléatoire. Nous ne pouvons comparer les résultats obtenus par ces derniers avec les nôtres puisqu'ils ont utilisé l'ampicilline à titre de substrat au lieu de la nitrocéfine. De plus, leurs taux d'activité ont été mesurés par résistance bactérienne à des concentrations croissantes d'antibiotique (CMI).

---

[7] Cette boucle fut rejetée rapidement lors de notre design du PCA puisqu'elle est située beaucoup trop en position C-terminale de la protéine séparant ainsi la β-lactamase en deux fragments de grandeur inégale (250 versus 20 acides aminés)

La seconde expérience consiste à permuter de façon circulaire l'enzyme. Il est possible, de cette manière, de vérifier si le repliement ainsi que l'activité de l'enzyme peuvent être retrouvés suite à de profonds changements au niveau de l'ordre de la séquence primaire de l'enzyme (Heinemann *et al.*, 1995). Cette permutation peut aussi nous apporter beaucoup de renseignements concernant la stabilité des fragments générés puisque les deux nouvelles régions N- et C-terminales sont maintenant accessibles à l'environnement de la solution. Plusieurs protéines ont été permutées de façon circulaire et deux d'entres elles, la β-glucanase H et le domaine SH3 de l'α-spectrin, ont été cristallographiées (Hahn *et al.*, 1994; Viguera *et al.*, 1996). Dans ces deux cas, l'on remarque très peu de changements au niveau de la structure tri-dimensionnelle des protéines étudiées (Pieper *et al.*, 1997). Ces changements sont principalement localisés au niveau de l'espaceur ainsi qu'au site de coupe. La β-lactamase PC1 de *Staphylococcus aureus* a été permutée à deux endroits différents par Pieper *et al.*. Puisque la β-lactamase possède des extrémités N- et C-terminales à proximité l'une de l'autre (Iwai *et al.*, 1999), Pieper *et al.* les ont fusionnées avec un espaceur de 8 acides aminés de manière à conserver une distance normale entre ces régions. Ils ont ensuite généré deux nouveaux sites de coupe soit juste avant Gly^{228} et avant la Gly^{254}. De plus, ils ont cristallysé et analysé la structure de la permutation à la position Gly^{254} (Pieper *et al.*, 1997). Le profil enzymatique (test de survie contre l'action de l'ampicilline) de la permutation à la position 254 affiche une activité semblable à celle de l'enzyme de type sauvage tandis qu'une permutation à la position 228 montre une diminution considérable de l'activité (0,5 à 1% de l'activité originale).

Pour notre part, nous avons fusionné les extrémités N- et C-terminales naturelles de la β-lactamaseΔ par l'espaceur de 15 acides aminés et généré ensuite un nouveau site de coupure directement au niveau de Glu^{197} de la boucle ϕ. Même après d'importants changements au niveau de la séquence primaire suite à une permutation circulaire de la protéine, nous conservons toujours 20% de l'activité originale normalement retrouvée avec la β-lactamaseΔ.

Cet abaissement d'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine au niveau des extraits cellulaires peut provenir de deux causes: premièrement le repliement de la protéine peut

être grandement affecté diminuant ainsi la quantité de protéines actives au niveau des extraits cellulaires. De plus, lors de la permutation circulaire, les nouvelles extrémités N- et C-terminales générées sont maintenant accessibles au solvant et plutôt hydrophobes, ce qui causerait la formation d'aggrégats pouvant empêcher le repliement adéquat de la protéine mutée. D'un autre côté, le site actif de la protéine peut être fortement touché en changeant la position de certain acides aminés clés à l'hydrolyse du substrat. Une combinaison de ces causes peut aussi être possible.

Le choix du site de coupure semble bon puisque nous conservons l'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine même après de profondes modifications au niveau de la séquence primaire de la boucle ϕ. Bien que nous ne puissions comparer avec aucun autre site de coupure, la préservation d'activité ainsi que les études réalisées par Hallet *et al.* nous a incité à arrêter la recherche ainsi qu'à poursuivre avec ce site de coupure.

4.1.3. Complémentation des fragments de la β-lactamase

Nous avons utilisé deux systèmes de dimérisation pour déterminer si la complémentation des fragments de la β-lactamase est possible via l'assistance de protéines interagissantes chez les cellules de mammifère. Le premier utilise les zippers de leucine GCN4 comme protéine interagissantes.

Dans le meilleur des cas (lorsque les zippers de leucine GCN4 sont en position N-terminale), nous obtenons un rendement de 4 à 8 fois plus élevé que le niveau basal provenant du vecteur d'expression pcDNA3.1.1. (4 fois plus élevé pour les études *in vivo* et 6 à 8 fois pour les études *in vitro*). Deux combinaisons d'orientations des fragments fonctionnent très bien : lorsque BLF[1] est positionné en N- ou en C-terminal des fusions et toujour en compagnie de BLF[2] lorsque celui-ci est en position C-terminale. Le fait que BLF[1] soit capable de fonctionner dans deux conditions différentes donne plus de latitude au système. En effet, on retrouve souvent des éléments importants à des positions spécifiques chez certaines protéines (Borner *et al.*, 1994). Ces éléments peuvent être

importants pour la dimérisation, la localisation protéique ou simplement pour la régulation de cette dernière (éléments de phosphorylation). Lorsque ces éléments sont situés aux extrémités N- ou C-terminales de la protéine, les fragments de la β-lactamase peuvent venir influencer le comportement de ces éléments clés. Puisque BLF[1] peut être utilisé aux deux extrémités d'une protéine, cela augmente la liberté dans le choix des orientations.

Lorsque le fragment [2] est en position N-terminale, l'activité due à la complémentation des fragments est inexistante. Selon nous, les fusions protéiques avec BLF[2] en position N-terminale s'aggrègent dues à la présence de résidus très hydrophobes au début de la séquence de la fusion protéique (Met-Leu-Leu-Thr-Leu) (figure #14). En effet, cette séquence est normalement retrouvée au début d'une hélice située en plein milieu de la séquence de la β-lactamase (figure #14). Donc, dans un environnement différent, beaucoup plus accessible au solvant, cette région très hydrophobe pourrait former des amats protéiques rendant la complémentation impossible. Il est vrai que cette séquence est aussi présente lorsque BLF[2] est positionné en C-terminale, par contre l'environnement retrouvé dans ce cas est semblable à celui perçu chez la protéine de type sauvage puisqu'elle est située au milieu de la fusion. Cette région se retrouve donc masquée par la présence de l'espaceur et du zipper de leucine GCN4. Il semble aussi que ce comportement de BLF[2] ne soit pas simplement spécifique au système de dimérisation des zippers de leucine GCN4. En effet, de récents résultats obtenus par l'étude des voies de signalisation apoptotique de la mitochondrie via la dimérisation de Bad et de Bcl-2 avec le PCA de la β-lactamase (étude en cours) viennent supporter le comportement du fragment [2]. Dans cette dernière étude lorsque BLF[2] est en position N-terminale, nous observons une diminution considérable de la complémentation des fragments.

Un point important est l'absence de complémentation spontanée et d'activité intrinsèque des fragments. En effet, lorsque les domaines d'oligomérisation ne sont pas capable d'interagir, il y a absence d'activité dû à l'absence de complémentation et d'activité intrinsèque des fragments. Nous avons utilisé, Bcl-2Δ à titre de contrôle négatif dans le but de démontrer que les fragments ne sont pas capable de se réassocier sans l'assistance apportée par des protéines interagissantes. Pour que Bcl-2Δ soit un bon contrôle négatif, il se doit d'être capable de dimériser avec une autre protéine et ainsi

observer une activité provenant de la complémentation des fragments de la β-lactamase. Nous avons pu démontrer récemment que Bcl-2Δ est capable de dimériser avec Bad (protéines appartenant à la voie de signalisation apoptotique impliquée à la mitochondrie) peut importe l'orientation du fragments [1] mais seulement lorsque le fragment [2] est en position C-terminale (manuscrit en préparation). Ces résultats sont consistants avec le comportement du fragment [2] en position N-terminale.

Le second système fait appel à la dimérisation des protéines FKBP et du domaine FRB de la protéine FRAP (Chen *et al.*, 1995). La formation de complexes FKBP-rapamycine-FRB a aussi été détectée par la complémentation des fragments de la β-lactamase en cellules COS. Nous avons déterminé une dose-réponse de l'activité de la complémentation des fragments de la β-lactamase dépendante de la concentration de rapamycine alors que le réassemblement des fragments lorsque les domaines d'oligomérisation ne sont pas compatibles est indépendant de cette concentration de rapamycine. Nous avons déterminé un K_d pour le système de dimérisation FKBP-rapamycine-FRB de 4 nM en comparaison avec les valeurs de 6 nM obtenue avec l'essai du PCA-DHFR (Remy *et al.*, 1999) et de 3 nM obtenue de façon *in vitro* (Chung *et al.*, 1992). FK506, un inhibiteur compétitionnant pour l'association à FKBP avec la rapamycine, diminue le signal d'hydrolyse procuré par la complémentation des fragments de la β-lactamase avec un K_i de 450 nM, comparable avec les valeurs obtenues in vivo avec le PCA-DHFR (Remy *et al.*, 1999) et in vitro (Chung *et al.*, 1992).

4.2. CONCLUSIONS

Nous avons mis au point un nouvel essai de complémentation protéique pour l'étude des interactions protéine-protéine *in vitro* et *in vivo* chez les cellules de mammifères. L'essai est basé sur le réassemblement et le repliement de deux fragments distincts et inactifs de la β-lactamase TEM-1 de *Escherichia coli* avec l'assistance de protéines interagissantes. Nous avons démontré que la complémentation des fragments de la β-lactamase est possible grâce à l'interaction spontanée des zippers de leucine GCN4. Mais aussi grâce à l'induction de la dimérisation de FKBP et le domaine FRB de FRAP en

réponse à des doses croissantes de rapamycine. De plus, il y a absence de réassemblement spontané des fragments de la β-lactamase. Nous avons établi que la complémentation n'a pas lieu lorsque le fragment [2] est en position N-terminale et que ceci est probablement causé par l'aggrégation des régions hydrophobes des fusions ou encore par une incapacité des fragments de se replier à cause d'une topologie protéique inadéquate au repliement.

Comme toutes les méthodes d'étude des interactions protéine-protéine, le PCA de la β-lactamase possède des avantages et des désavantages qui lui sont spécifiques. Les avantages sont 1) l'absence de bruit de fond chez possiblement toutes les cellules de mammifère permettant ainsi l'étude des interactions biochimiques eucaryotes; 2) l'amplification du signal permettant de déterminer des taux d'hydrolyse dépendant de la qualité de l'interaction répertoriée comme démontré avec la dose-réponse de rapamycine versus les taux d'hydrolyse provenant de la complémentation des fragments de la β-lactamase; 3) le PCA-β-lactamase permet aussi la mesure directe de la dimérisation protéique consentant ainsi une analyse cinétique de l'interaction étudiée; 4) il est possible de travailler avec des protéines membranaires; 5) l'essai peut se faire *in vitro* et *in vivo*; 6) il est facile à utiliser et peu coûteux lorsque utilisé de manière *in vitro*; 7) l'essai peut être adapté pour faire des études à grande échelle en plaque à 96 ou 384 puits. Les désavantages sont : 1) présentement l'essai fonctionne seulement en cellules de mammifère; 2) actuellement il est impossible de faire de la localisation d'interaction protéique mais nous travaillons à la mise au point d'un système (section 4.3); 3) il est impossible de faire de la sélection clonale avec l'essai. Le tableau III résume les principaux avantages et désavantages du PCA-β-lactamase et le place dans le contexte des autres méthodes d'étude des interactions protéine-protéine. Le PCA de la β-lactamase constitue un essai fort prometteur pour l'étude des interactions protéine-protéine et des voies biochimiques cellulaire.

Système	Types de cellule	Protéines membranaires	Localisation de l'interaction	Mesure directe ou indirecte	Amplification du signal	*In vitro* et/ou *in vivo*	Sélection clonale	Particularité
Double-hybride Fields *et al.*, 1989 Vidal *et al.*, 1999	Levure	Non	Non	Indirecte	Oui	*In vivo*	Oui	Très connu et très utilisé
FRET/BRET Selvin, 2000 Xu *et al.*, 1999	Pro/Euc	Oui	Oui	Directe	Non	*In vivo*	Non	Dépend de la qualité du transfert d'énergie
Co-immunoprécipitaion	Pro/Euc	Oui	Non	Directe	Non	*In vitro*	Non	Dépend de la qualité des anticorps
Système de recrutement SOS (SRS) Aronheim *et al.*, 1997	Levure	Non	Non	Indirecte	Oui	*In vivo*	Oui	Système spécifique à la levure
Complémentation β-galactosidase Rossi *et al.*, 1997	Pro/Euc	Oui	Non	Directe	Oui	*In vitro et in vivo*	Non	Peut être influencé par des contraintes stériques
Split-ubiquitin Johnsson *et al.*, 1994	Pro/Euc	Oui	Non	Indirecte	Oui	*In vivo*	Non	Base du PCA
PCA-DHFR Michnick *et al.*, 2000	Pro/Euc	Oui	Oui	Directe	Non	*In vivo*	Oui	Sélection clonale chez les CHO DUXB-11
PCA-β-lactamase	Euc	Oui	Non[3]	Directe	Oui	*In vitro et in vivo*	Non	Facile à utiliser et rapide

Tableau III Résumé des principaux avantages et désavantages observés chez les diverses méthodes d'étude d'interactions protéine-protéine incluant le PCA β-lactamase.

[3] Peut être possible voir section 4.3

4.3. PERSPECTIVES

Maintenant que nous avons mis au point un nouvel essai pour l'étude des interactions protéine-protéine, il faut appliquer cet essai à des questions biologiques. Présentement, le PCA de la β-lactamase est utilisé pour l'étude de 3 sujets dans le laboratoire du Dr. Michnick : l'étude de la voie de signalisation de Ras, celle du TGF-β et l'importance de la dimérisation des protéines apoptotiques impliquées au niveau de la mitochondrie.

Dernièrement, nous avons procédé à la mutation de résidus pouvant augmenter la solubilité des fragments diminuant ainsi les problèmes d'aggrégation et contribuant à une augmentation de l'activité. Notamment la mutation M182T qui agit à titre de suppresseur global (Huang *et al.*, 1997; Sideraki *et al.*, 2000). Nos résultats préliminaires montrent une augmentation considérable de l'activité avec le système de dimérisation des zippers de leucine GCN4 lorsque le fragment [1] est pourvu de cette mutation (environ 20 fois plus que le bruit de fond provenant du vecteur vide). Nous procéderons à plusieurs autres mutations afin de mettre au point un essai des plus performants. Il faut aussi purifier les fragments et en faire l'étude *in vitro* afin de bien comprendre comment la complémentation et le repliement des fragments se produisent.

Une limitation importante du système est l'impossibilité de localiser les interactions au niveau intra-cellulaire. Ceci est causé par la diffusion du produit à l'intérieur des cellules. Nous pensons pouvoir remédier à ce problème en utilisant la " Beta-Lactamase Inhibitory Protein " (BLIP) qui interagit fortement avec la β-lactamase et possède un *K*d tout près du picomolaire (Strynadka *et al.*, 1994). Nous croyons qu'en fusionnant BLIP à la GFP, nous pourrons localiser l'interaction via la fluorescence de la GFP une fois que BLIP aura interagit avec les fragments reconstitués de la β-lactamase.

RÉFÉRENCES

Adachi, H.; Ohta, T. and Matsuzawa, H. (1991). Site-directed mutants, at position 166, of RTEM-1 beta-lactamase that form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin. *J Biol Chem* **266**(5); pp.: 3186-91.

Adams, M. D., *et al.* (2000). The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science* **287**; pp.: 2185-2195.

Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**(1036); pp.: 321-31.

Ambler, R. P.; Coulson, A. F.; Frere, J. M.; Ghuysen, J. M.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R. C.; Tiraby, G. and Waley, S. G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* **276**(Pt 1); pp.: 269-70.

Andrews, J.; Fierke, C. A.; Birdsall, B.; Ostler, G.; Feeney, J.; Roberts, G. C. and Benkovic, S. J. (1989). A kinetic study of wild-type and mutant dihydrofolate reductases from Lactobacillus casei. *Biochemistry* **28**(14); pp.: 5743-50.

Arndt, K. M.; Pelletier, J. N.; Muller, K. M.; Alber, T.; Michnick, S. W. and Pluckthun, A. (2000). A heterodimeric coiled-coil peptide pair selected in vivo from a designed library-versus-library ensemble. *J Mol Biol* **295**(3); pp.: 627-39.

Aronheim, A.; Zandi, E.; Hennemann, H.; Elledge, S. J. and Karin, M. (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* **17**(6); pp.: 3094-102.

Atanasov, B. P.; Mustafi, D. and Makinen, M. W. (2000). Protonation of the beta-lactam nitrogen is the trigger event in the catalytic action of class A beta-lactamases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7); pp.: 3160-5.

Banerjee, S.; Pieper, U.; Kapadia, G.; Pannell, L. K. and Herzberg, O. (1998). Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase. *Biochemistry* **37**(10); pp.: 3286-96.

Bar-Nun, S.; Shneyour, Y. and Beckmann, J. S. (1983). G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta* **741**(1); pp.: 123-7.

Bear, D. M.; Turck, M. and Petersdorf, R. G. (1970). Ampicillin. *Med Clin North Am* **54**(5); pp.: 1145-59.

Benkovic, S. J. (1980). On the mechanism of action of folate- and biopterin-requiring enzymes. *Annu Rev Biochem* **49**; pp.: 227-51.

Bertino, J. R. and Hillcoat, B. L. (1968). Regulation of dihydrofolate reductase and other folate-requiring enzymes. *Adv Enzyme Regul* **6**; pp.: 335-49.

Blakely, B. T.; Rossi, F. M.; Tillotson, B.; Palmer, M.; Estelles, A. and Blau, H. M. (2000). Epidermal growth factor receptor dimerization monitored in live cells. *Nat Biotechnol* **18**(2); pp.: 218-22.

Borner, C.; Martinou, I.; Mattmann, C.; Irmler, M.; Schaerer, E.; Martinou, J. C. and Tschopp, J. (1994). The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J Cell Biol* **126**(4); pp.: 1059-68.

Bray, D. (1998). Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**; pp.: 59-75.

Bystroff, C. and Kraut, J. (1991). Crystal structure of unliganded Escherichia coli dihydrofolate reductase. Ligand-induced conformational changes and cooperativity in binding. *Biochemistry* **30**(8); pp.: 2227-39.

Cabanas, M. J.; Vazquez, D. and Modolell, J. (1978). Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur J Biochem* **87**(1); pp.: 21-7.

Cantu, C., 3rd and Palzkill, T. (1998). The role of residue 238 of TEM-1 beta-lactamase in the hydrolysis of extended-spectrum antibiotics. *J Biol Chem* **273**(41); pp.: 26603-9.

Cantu, C., 3rd; Huang, W. and Palzkill, T. (1997). Cephalosporin substrate specificity determinants of TEM-1 beta-lactamase. *J Biol Chem* **272**(46); pp.: 29144-50.

Cantu, C., III; Huang, W. and Palzkill, T. (1996). Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237-240 of TEM-1 beta-lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime. *J Biol Chem* **271**(37); pp.: 22538-45.

Chen, J.; Zheng, X. F.; Brown, E. J. and Schreiber, S. L. (1995). Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11); pp.: 4947-51.

Christensen, H.; Martin, M. T. and Waley, S. G. (1990). Beta-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl-enzyme mechanism. *Biochem J* **266**(3); pp.: 853-61.

Chung, J.; Kuo, C. J.; Crabtree, G. R. and Blenis, J. (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* **69**(7); pp.: 1227-36.

Consortium, T. C. e. S. (1998). Genome Sequence of the Nematode C. elegans: A Platform for Investigating Biology. *Science* **282**; pp.: 2012-2018.

Delaire, M.; Labia, R.; Samama, J. P. and Masson, J. M. (1992). Site-directed mutagenesis at the active site of Escherichia coli TEM-1 beta-lactamase. Suicide inhibitor-resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. *J Biol Chem* **267**(29); pp.: 20600-6.

Escobar, W. A.; Miller, J. and Fink, A. L. (1994). Effects of site-specific mutagenesis of tyrosine 105 in a class A beta-lactamase. *Biochem J* **303**(Pt 2); pp.: 555-8.

Eustice, D. C. and Wilhelm, J. M. (1984). Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eucaryotic protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **26**(1); pp.: 53-60.

Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230); pp.: 245-6.

Filman, D. J.; Bolin, J. T.; Matthews, D. A. and Kraut, J. (1982). Crystal structures of Escherichia coli and Lactobacillus casei dihydrofolate reductase refined at 1.7 A resolution. II. Environment of bound NADPH and implications for catalysis. *J Biol Chem* **257**(22); pp.: 13663-72.

Gibson, R. M.; Christensen, H. and Waley, S. G. (1990). Site-directed mutagenesis of beta-lactamase I. Single and double mutants of Glu-166 and Lys-73. *Biochem J* **272**(3); pp.: 613-9.

Gingras, A. C.; Raught, B. and Sonenberg, N. (1999). eIF4 INITIATION FACTORS: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**(1); pp.: 913-963.

Goffeau, A.; Barrell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E. J.; Mewes, H. W.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H. and Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science* **274**; pp.: 546-567.

Gonzalez, A.; Jimenez, A.; Vazquez, D.; Davies, J. E. and Schindler, D. (1978). Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **521**(2); pp.: 459-69.

Grandori, C.; Cowley, S. M.; James, L. P. and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**(1); pp.: 653-699.

Guillaume, G.; Vanhove, M.; Lamotte-Brasseur, J.; Ledent, P.; Jamin, M.; Joris, B. and Frere, J. M. (1997). Site-directed mutagenesis of glutamate 166 in two beta-lactamases. Kinetic and molecular modeling studies. *J Biol Chem* **272**(9); pp.: 5438-44.

Hahn, M.; Piotukh, K.; Borriss, R. and Heinemann, U. (1994). Native-like in vivo folding of a circularly permuted jellyroll protein shown by crystal structure analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22); pp.: 10417-21.

Hallet, B.; Sherratt, D. J. and Hayes, F. (1997). Pentapeptide scanning mutagenesis: random insertion of a variable five amino acid cassette in a target protein. *Nucleic Acids Res* **25**(9); pp.: 1866-7.

Heinemann, U. and Hahn, M. (1995). Circular permutation of polypeptide chains: implications for protein folding and stability. *Prog Biophys Mol Biol* **64**(2-3); pp.: 121-43.

Henderson, G. B.; Russell, A. and Whiteley, J. M. (1980). A fluorescent derivative of methotrexate as an intracellular marker for dihydrofolate reductase in L1210 cells. *Arch Biochem Biophys* **202**(1); pp.: 29-34.

Herzberg, O. (1991). Refined crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.0 A resolution. *J Mol Biol* **217**(4); pp.: 701-19.

Herzberg, O. and Moult, J. (1987). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.5 A resolution. *Science* **236**(4802); pp.: 694-701.

Huang, W. and Palzkill, T. (1997). A natural polymorphism in beta-lactamase is a global suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16); pp.: 8801-6.

Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**(1); pp.: 113-27.

Iwai, H. and Pluckthun, A. (1999). Circular beta-lactamase: stability enhancement by cyclizing the backbone. *FEBS Lett* **459**(2); pp.: 166-72.

Jamin, M.; Damblon, C.; Bauduin-Misselyn, A. M.; Durant, F.; Roberts, G. C.; Charlier, P.; Llabres, G. and Frere, J. M. (1994). Direct n.m.r. evidence for substrate-induced conformational changes in a beta-lactamase. *Biochem J* **301**(Pt 1); pp.: 199-203.

Jelsch, C.; Lenfant, F.; Masson, J. M. and Samama, J. P. (1992). Beta-lactamase TEM1 of E. coli. Crystal structure determination at 2.5 A resolution. *FEBS Lett* **299**(2); pp.: 135-42.

Jelsch, C.; Lenfant, F.; Masson, J. M. and Samama, J. P. (1992). Crystallization and preliminary crystallographic data on Escherichia coli TEM1 beta-lactamase. *J Mol Biol* **223**(1); pp.: 377-80.