



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen

Faculté des sciences de la nature et de la vie
et des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie

Laboratoire de Recherche
sur les Macromolécules

Thèse

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Domaine juxta-membranaire de la connexine43 :
Détermination par RMN en solution de la structure et de
l'interaction avec la tubuline et les microtubules**

Présentée par :

Amal BRIKCI NIGASSA née SAÏDI

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président : Pr Daoudi CHABANE SARI de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen

Examinateur : Pr Hafida MERZOUK de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen

Examinateur : Dr Patrick CURMI de l'Université d'Évry-Val d'Essonne (France)

Examinateur : Pr Zahia BOUCHERIT de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen

Promoteur : Dr Kamal BENMANSOUR de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen

Co-promoteur : Pr Philippe SAVARIN de l'Université Paris 13 (France)

Résumé

Les connexines constituent une famille de protéines membranaires intégrales qui forment les jonctions communicantes. Ces protéines font partie d'une famille multigénique avec 21 isoformes chez l'homme. La Cx43 est le membre le plus abondant de cette famille et le plus étudié. Tout au long de son cycle de vie, la Cx43 est régulée à travers des modifications post-traductionnelles et/ou par des interactions protéine-protéine qui se produisent essentiellement au niveau de son domaine C-terminal (*Cx43CT*).

Nous avons choisi d'étudier l'interaction de la tubuline et des microtubules avec un peptide (K26D) correspondant à la région juxta-membranaire (K234-D259) du domaine *Cx43CT* par RMN.

Nos résultats ont démontré que la région juxta-membranaire de la Cx43 interagit directement et spécifiquement avec la tubuline et les microtubules et adopte lors de sa liaison à la tubuline une structure compacte hélicoïdale. En outre, nos travaux ont montré que cette interaction implique au moins deux groupes de résidus $^{239}\text{RV}^{240}$ et $^{247}\text{YHAT}^{250}$ du *Cx43CT* qui se trouvent à proximité immédiate de ces partenaires.

Le résidu Y247, situé au sein d'un site de phosphorylation par la protéine kinase *v-Src* est impliqué dans l'interaction de la région juxta-membranaire de la Cx43 avec la tubuline et les microtubules. Pour cela, nous avons tenté d'étudier l'influence de la phosphorylation du résidu Y247 sur cette liaison. Nos résultats ont montré que cette interaction est négativement régulée par cette phosphorylation.

Enfin, pour progresser dans la compréhension de la compétition entre la protéine Smad2 et la Cx43 pour leur liaison au système tubuline/microtubules. Nous avons étudié la compétition entre le peptide K26D et un autre peptide issu du domaine *MH2* de la protéine Smad2 pour leur liaison à la tubuline. Nous avons démontré que la région M416-T434 du domaine *MH2* incluse dans le peptide issu de la protéine Smad2 participe à sa liaison à la tubuline. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de compétition entre les peptides issus de Cx43 et de Smad2 pour leur interaction avec la tubuline.

L'ensemble des résultats sont discutés en fonction de l'état de l'art et de la littérature.

Abstract

The connexins constitute a family of integral membrane proteins that form gap junctions. In humans, the connexins belong to a multigene family of 21 isoforms. Cx43 is the most abundant and studied member of this family. During its life cycle, Cx43 is regulated by post-translational modifications and/or protein-protein interactions that occur primarily in its C-terminal domain (*Cx43CT*). We chose to study the interaction of tubulin and microtubules with a peptide (K26D) corresponding to the juxtamembrane region (K234-D259) of the Cx43CT domain by NMR spectroscopy.

We demonstrated that the juxtamembrane region of Cx43 interacts directly and specifically with tubulin and microtubules and adopt upon binding to tubulin a compact helical structure. In addition, our results showed that this interaction involves at least two clusters of residues ²³⁹RV²⁴⁰ and ²⁴⁷YHAT²⁵⁰ of *Cx43CT* which are in close proximity of these partners during interaction.

The Y247 residue, located within a phosphorylation site by the protein kinase *v-Src* is involved in the interaction of the juxtamembrane region of the Cx43 with tubulin and microtubules. For this reason, we tried to study the influence of phosphorylation of the Y247 residue on this binding. Our results have shown that this interaction is negatively regulated by this phosphorylation.

Finally, in order to progress in the understanding of the competition between Smad2 protein and Cx43 for their binding to the tubulin/microtubules system, we probed the putative competition between the K26D peptide and another one from the MH2 domain of Smad2 protein for their binding to tubulin. We succeeded showing that the binding of the Smad2 peptide to tubulin involves the M416-T434 region of its MH2 domain. However, we did not note evidence a competition between the peptides derived from Cx43 and Smad2.

The results are discussed in regards to the state of the art and of the current literature.

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire Structure et Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP) à l'Université d'Évry-Val d'Essonne (Évry, France) dirigé par le Docteur Patrick CURMI.

Pour la réalisation de cette thèse, j'ai pu bénéficier d'une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) de 18 mois et d'un complément de bourse de la part du laboratoire SABNP. J'adresse mes sincères remerciements à ces institutions.

Je tiens à témoigner tout mon respect et ma reconnaissance au directeur du laboratoire SABNP le Docteur Patrick CURMI pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail, pour l'intérêt qu'il a porté à la discussion et au développement de ce sujet, pour m'avoir consacré de son temps précieux malgré toutes ses nombreuses responsabilités et pour être à l'écoute des besoins de chaque membre du laboratoire. Je le remercie également pour les corrections apportées à ce manuscrit et d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse à l'étranger, le Professeur Philippe SAVARIN de l'Université Paris 13. Je lui témoigne aussi toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant de travailler au sein du laboratoire SABNP. Je le remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour toutes les méthodes et techniques auxquelles il m'a initiée et notamment celles de l'étude des protéines par RMN et pour toutes ses remarques constructives au cours de la correction de ce manuscrit.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Docteur Kamal BENMANSOUR de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen d'avoir accepté de m'encadrer. Je lui suis reconnaissante de m'avoir laissé l'opportunité de changer de thème et développer une nouvelle thématique de recherche au laboratoire SABNP. Je le remercie pour son aide précieuse, pour sa disponibilité et sa compréhension.

Je tiens à adresser également mes remerciements les plus sincères au Professeur Daoudi CHABANE SARI de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie de la même manière le Professeur Hafida MERZOUK de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen qui est à l'origine de la collaboration entre l'Université de Tlemcen et l'Université d'Évry depuis 2009. Je la remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

J'adresse également mes remerciements les plus respectueux au Professeur Zahia BOUCHERIT de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur Flavio TOMA pour tous les efforts qu'il fournit pour transmettre ses connaissances et son savoir-faire en matière de RMN et de biochimie des protéines, en assurant des cours pour les étudiants de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen. Je lui témoigne aussi toute ma reconnaissance pour l'aide qu'il m'a apportée durant mon séjour en France.

Je voudrais aussi adresser un remerciement particulier au Docteur Elisabeth ADJADJ pour son accompagnement le long de mon séjour au laboratoire SABNP, pour ses conseils, ses idées, son humour et surtout son amitié. Je remercie de la même manière les Docteurs Marie-Jeanne CLEMENT et Latifa ZIANI pour leur amitié, pour ce qu'elles m'ont appris concernant l'utilisation des méthodes et techniques RMN et pour leur contribution à la qualité des résultats obtenus.

Je remercie également Madame Lydia LEBOUIL pour le travail conséquent de coordination qu'elle assure au sein du laboratoire SABNP pour l'accueil des doctorants étrangers, pour l'aide qu'elle m'a apportée concernant les démarches administratives ainsi que pour son soutien. Je remercie aussi du fond du cœur toutes les personnes qui m'ont soutenue et beaucoup aidée durant mon séjour en France et tout particulièrement Vandana JOSHI pour son enthousiasme, sa joie de vivre et ses qualités humaines.

Je remercie enfin mes enfants pour leur patience le long de ce travail et j'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à ce travail et notamment Amine BRIKCI NIGASSA, Nabila BENARIBA et Mohammed-Reda BRIKCI NIGASSA.

*Je dédie ce travail à ma mère, à la mémoire de mon père,
À mes enfants,
À tous ceux qui trouvent dans la recherche leur refuge et leur passion.*

Table des matières

Introduction	15
Partie 1 : Synthèse bibliographique	21
Chapitre I : Connexines & Jonctions communicantes	22
1. Connexines : unités structurales des jonctions communicantes	23
1.1 <i>Les connexines : une famille de protéines multigéniques</i>	23
1.2 <i>Les connexines s'organisent en canaux jonctionnels intercellulaires</i>	25
1.3 <i>Les connexines : de la synthèse à la formation des plaques jonctionnelles</i>	29
2. Fonctions des jonctions communicantes	34
3. Régulation de la communication jonctionnelle	37
Chapitre II : Interaction de la Cx43 avec la tubuline et les microtubules	39
1. Tubulines : unités structurales des microtubules	40
2. Microtubules : éléments instables et dynamiques	43
3. Microtubules : partenaires de la connexine43	45
Chapitre III : Analyse structurale des protéines par RMN	51
1. Structure générale des protéines	52
1.1 <i>Protéines : polymères d'acides aminés</i>	52
1.2 <i>Liaison peptidique</i>	54
1.3 <i>Niveaux structuraux des protéines</i>	56
1.4 <i>Diagramme de Ramachandran</i>	60
2. Analyse structurale des peptides/protéines par RMN	62
2.1 <i>Principe de la spectroscopie par RMN</i>	62
2.2 <i>Détermination de la structure tridimensionnelle des peptides/protéines par RMN</i>	65
Préparation de l'échantillon	68
Acquisition des spectres et traitement de signal	68
Attribution des spectres	71
Génération des contraintes structurales.....	75
Calcul de structure.....	79
2.3 <i>Etude de l'interaction moléculaire d'un ligand avec un récepteur protéique</i>	81
Partie 2 : Travaux expérimentaux & Résultats	83
Chapitre IV : Matériel & Méthodes	84
1. Choix des peptides K26D, K26D-P et M19T	85

2. Purification de la tubuline	87
3. Etude de l'impact du peptide K26D sur la polymérisation des microtubules	87
4. Étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules par co-sédimentation	88
5. Caractérisation structurale de l'interaction des peptides avec la tubuline	89
5.1 Préparation des échantillons.....	90
5.2 Acquisition des spectres	90
5.3 Attribution des spectres	91
5.4 Génération des contraintes structurales.....	92
5.5 Modélisation moléculaire.....	93
6. Etude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules par STD-NMR... ..	94
7. Étude de l'interaction du peptide K26D-P avec la tubuline par STD-NMR	95
8. Étude de la compétition entre les peptides M19T et K26D pour leur liaison à la tubuline	96
Chapitre V : Résultats & Interprétation	97
1. Le peptide K26D ne semble pas affecter la dynamique de polymérisation des microtubules.. ..	98
2. Co-sédimentation du peptide K26D avec les microtubules.....	98
3. Le peptide K26D adopte une conformation en hélice après sa liaison à la tubuline.....	99
4. La tyrosine 247 est impliquée dans l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules.....	109
5. La phosphorylation du peptide K26D sur le résidu Y247 inhibe sa liaison à la tubuline	115
6. Les peptides M19T et K26D semblent interagir simultanément avec la tubuline sur des sites différents.....	119
Chapitre VI : Discussion globale	126
Conclusion & Perspectives	136
Références bibliographiques.....	139

Liste des abréviations

+TIP : *Plus-end tracking proteins*

1D, 2D, 3D, 4D : Une, deux, trois, ou quatre dimensions

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AJ : *Adherens junctions*

AMPc : Adénosine-3',5'-MonoPhosphate Cyclique

APS : PerSulfate d'Ammonium

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

BMP : *Bone Morphogenetic Proteins*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

CAM : *Cell Adhesion Molecules*

CDC2 : *Cell Division Control 2*

CDK1 : *Cyclin -Dependent Kinase 1*

CK1 : Caséine Kinase 1

CLIP-170 : *Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa*

CMTX : *Charcot-Marie-Tooth* lié au chromosome X

CNS : *Crystallography and NMR System*

Co-Smad : *Common mediator Smads*

COSY : *COrrrelation Spectroscopy*

CSI : *Chemical Shift Index*

Cx : Connexine

Cx43CT : Domaine C-Terminal de la Connexine43

DSA : 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-ammonium trifluoroacétate

DSS : 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate

EB1 : *End-Binding protein 1*

EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique

EGF : *Epidermal Growth Factor* (facteur de croissance épidermique)

EGTA : Ethylène Glycol TétraAcétique

Erk 1/2 : *Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2*

ERK5 : *Extracellular signal-Regulated Kinase 5*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GJ : *Gap Junction*

GTP : Guanosine TriPhosphate

HHPred : *Homology detection and structure prediction by HMM-HMM comparison*

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*

HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IP₃ : Inositol triPhosphate

IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry* (Union internationale de chimie pure et appliquée).

M : Masse Moléculaire

MAP : *Microtubule-Associated Proteins*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCAK : *Mitotic Centromere-Associated Kinesin*

MES : Acide 2-(*N*-morpholino)éthanesulfonique

MH : *Mad Homology*

MMP : *Matrix MetalloProteinases*

MTOC : *MicroTubule-Organizing Center*

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

Nedd4 : *Neural precursor cell expressed, Developmentally Downregulated 4*

NMR : *Nuclear Magnetic Resonance*

NOE : *Nuclear Overhauser Effect*

NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

P34^{cdc2} : Protéine kinase dépendante des cyclines (protéine de 34 kDa codée par le gène *cdc2*)

PDB : *Protein Data Bank*

PDZ : Postsynaptic density/Disc-large/ZO1

PIPES : Pipérazine-*N,N'*-bis(acide 2-éthanesulfonique)

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PKG : Protéine Kinase G

ppm : parties par million

PTB : *PhosphoTyrosine Binding domain* (domaine de fixation des phosphotyrosines)

RE : Réticulum Endoplasmique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : *Root Mean Square Deviation* (valeur de l'écart quadratique moyen des coordonnées)

RPTP : *Receptor Protein Tyrosine Phosphatases*

R-Smad : *Receptor-regulated Smad*

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*

SH : *Src Homology*

SH2 : *Domaine Homologue à Src type 2*

SH3 : *Domaine Homologue à Src type 3*

Skp2 : *S-phase Kinase-associated Protein 2*

Src : *Sarcoma*

STD : *Saturation Transfer Difference*

SUMO : *Small Ubiquitin-like MOdifier*

TALOS : *Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity*

TEMED : *N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine*

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*

TJ : *Tight Junction*

TMS : *TetraMéthylSilane*

TOCSY : *Total Correlation Spectroscopy*

Ub : *Ubiquitine*

v-Src/c-Src : *Membres de la famille des protéines kinases Src virale et cellulaire*

ZO : *Zonula Occludens*

Table des figures

Figure 1.1 : Séquences combinées d'acides aminés pour la Cx32 et la Cx43 indiquant les résidus fonctionnellement importants	27
Figure 1.2 : Microscopie électronique d'une jonction communicante liant des hépatocytes adjacents chez la souris	30
Figure 1.3 : Schéma montrant les multiples niveaux structuraux d'une jonction communicante	30
Figure 1.4 : Représentation schématique des étapes de biosynthèse, d'assemblage et de dégradation des canaux jonctionnels	32
Figure 2.1: Structure d'un microtubule et de ses sous-unités	42
Figure 2.2 : Les plaques des jonctions communicantes dépendent des interactions homophiliques des cadhérines.....	47
Figure 2.3 : Domaines structuraux de Smad et leurs fonctions.....	50
Figure 3.1 : Identifiants recommandés pour les atomes des vingt acides aminés communs d'après les règles de la nomenclature IUPAC-IUB de 1969.....	53
Figure 3.2 : Liaison peptidique représentée dans sa conformation usuelle « trans » de l'oxygène carbonyle et l'hydrogène amide	54
Figure 3.3 : Dessin en perspective d'une partie d'une chaîne polypeptidique représentant deux unités peptidiques	55
Figure 3.4 : Schéma des liaisons hydrogène de plusieurs hélices polypeptidiques	57
Figure 3.5 : Modèle de liaisons hydrogène dans des feuillets plissés β	59
Figure 3.6 : Changement de direction dans les chaînes polypeptidiques.....	59
Figure 3.7 : Diagramme de Ramachandran.....	61
Figure 3.8 : Relation entre la constante d'écran et le déplacement chimique.....	65
Figure 3.9 : Protocole standard de la détermination de la structure tridimensionnelle des protéines par RMN	67
Figure 3.10 : Spectre homonucléaire 2D (^1H - ^1H) NOESY d'un inhibiteur de protéinase IIA (BUSI II A).....	70
Figure 3.11 : Attribution séquentielle des protéines par RMN ^1H	74
Figure 3.12 : Distances séquentielles et à moyenne portée ^1H - ^1H dans une chaîne polypeptidique.....	77
Figure 3.13 : Schéma indiquant les relations entre un spectre expérimental NOESY 2D (^1H - ^1H) et un polypeptide avec les extrémités de la chaîne indiquées par N et C	78

Figure 3.14 : Illustration de cartographie de groupe épitope pour un ligand en échange rapide entre un état lié et un état libre	82
Figure 4.1 : Représentation schématique de la hCx43 et des peptides K26D et K26D-P	85
Figure 4.2 : Représentation schématique de la protéine hSmad2 et de l'alignement des peptides M19T-K26D	87
Figure 5.1 : Le peptide K26D n'affecte pas la polymérisation apparente de la tubuline.....	98
Figure 5.2 : Le peptide K26D co-sédimente avec les microtubules.....	99
Figure 5.3 : La prédiction de la structure secondaire du peptide K26D montre une tendance à former une hélice.....	101
Figure 5.4 : Les <i>tr-NOE</i> témoignent d'un repliement du peptide K26D lors de son interaction avec la tubuline.....	102
Figure 5.5 : La <i>tr-NOESY</i> ne montre pas de structuration du peptide K26D en présence de BSA	103
Figure 5.6 : La structure moyenne du peptide K26D montre trois régions hélicoïdales.....	105
Figure 5.9 : L'interaction du peptide K26D avec la tubuline implique des résidus polaires, chargés et apolaires, y compris le résidu Y247	110
Figure 5.10 : L'interaction du peptide K26D avec les microtubules est globalement identique à celle en présence de la tubuline	111
Figure 5.11 : Le peptide K26D n'interagit pas avec la BSA.....	112
Figure 5.12 : Aucun proton du peptide K26D n'est affecté par l'irradiation à -0,5 ppm.	112
Figure 5.13 : Le repliement du peptide K26D lors de son interaction avec la tubuline rapproche les résidus en contact avec ce partenaire	114
Figure 5.14 : La phosphorylation du résidu Y247 empêche l'interaction du peptide K26D avec la tubuline.....	117
Figure 5.15 : Le peptide K26D-P n'est pas structuré en présence de la tubuline	118
Figure 5.16 : La STD-NMR montre que le peptide M19T interagit avec la tubuline.....	121
Figure 5.17 : Les peptides K26D et M19T ne semblent pas se lier au même site de la tubuline.....	123
Figure 5.18 : L'expérience STD-NMR des peptides K26D et M19T mis ensemble avec la tubuline montre la présence des même protons impliqués dans leur liaison avec cette protéine.....	124
Figure 5.19 : La <i>tr-NOESY</i> du mélange de ligands K26D et M19T ne présente aucun <i>NOE</i> inter-ligands.....	125

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Distribution tissulaire des connexines humaines et pathologies associées	24
Tableau 1.2 : Différences de longueur de la boucle cytoplasmique et du C-terminal de quelques connexines murines	28
Tableau 1.3 : Sites de phosphorylation de la Cx43	38
Tableau 3.1 : Angles de torsion approximatifs de quelques structures régulières	61
Tableau 3.2 : Propriétés nucléaires de quelques isotopes qui possèdent un spin	64
Tableau 3.3 : Déplacements chimiques des protons ^1H pour les résidus ^a des 20 acides aminés communs en <i>random coil</i>	73
Tableau 3.4 : Distances séquentielles courtes et à moyenne portée ^1H - ^1H dans les structures secondaires de polypeptide	77
Tableau 5.1 : Attributions des déplacements chimiques des protons du peptide K26D	100
Tableau 5.2 : Statistique structurale des 10 structures de plus basse énergie du peptide K26D lié à la tubuline	108
Tableau 5.3 : Attributions des déplacements chimiques des protons du peptide K26D-P	116
Tableau 5.4 : Attributions des déplacements chimiques des protons du peptide M19T	120

Introduction

Les connexines sont des protéines membranaires intégrales qui forment des structures hexamériques appelées « connexons ». Ces oligomères sont transloqués jusqu'à la membrane plasmique où ils constituent des héli-canaux qui, par arrimage à d'autres héli-canaux des cellules voisines, permettent la formation de canaux jonctionnels. Plusieurs canaux se regroupent en bouquets et constituent un type particulier de jonction cellulaire, notamment impliquée dans la signalisation paracrine et appelée « jonction communicante ». Ces jonctions permettent un passage rapide et passif de molécules, entraînées par leur gradient électrochimique, limité par leur masse moléculaire ($M < 1000$ Da). Ces molécules sont des métabolites (Glucose, ATP...), des ions (K^+ , Ca^{2+} ...) et des seconds messagers comme l'Inositol triPhosphate (IP_3) et l'AMP cyclique (AMPc) (Goodenough *et al.*, 1996 ; Goodenough et Paul, 2003 ; Goodenough et Paul, 2009).

Les connexines appartiennent à la famille des protéines à quatre domaines transmembranaires. L'organisation de ces domaines dans la membrane conduit à exposer deux boucles du côté extracellulaire et une boucle du côté intracellulaire, les domaines carboxy- et amino-terminal (C-terminal et N-terminal, respectivement) étant intracellulaires (Goodenough *et al.*, 1996 ; Saez *et al.*, 2003 ; Sosinsky et Nicholson, 2005). Les connexines constituent une famille multigénique comprenant 21 isoformes chez l'homme (Sohl et Willecke, 2004). Ces isoformes sont nommés généralement en fonction de leur masse moléculaire prédite en kilodaltons (Beyer *et al.*, 1987). Les connexines sont homologues dans leurs domaines transmembranaires, boucles extra-cytoplasmiques et domaines N-terminal. Par contre, le domaine C-terminal et la boucle intra-cytoplasmique présentent des séquences et des longueurs très diversifiées (Haefliger *et al.*, 1992 ; Saez *et al.*, 2003). La plupart des tissus des vertébrés expriment un ou plusieurs isotypes de connexines. La connexine43 ou Cx43 (connexine possédant une masse moléculaire de 43 kDa) est cependant le membre dont l'expression est la plus large dans les tissus et le mieux étudié de cette famille (Laird, 2006; Willecke *et al.*, 2002).

La principale fonction de la Cx43 est liée à sa capacité à former des canaux qui permettent aux cellules voisines de coordonner leurs activités en échangeant de petites molécules. Celles-ci peuvent être chargées ou non, ce qui permet de distinguer un couplage ionique d'un couplage métabolique. Cette communication est essentielle aussi bien au bon déroulement du développement embryonnaire qu'au maintien de l'homéostasie tissulaire à l'état adulte (Brissette *et al.*, 1994; Goodenough *et al.*, 1996 ; Saez *et al.*, 2003). Des fonctions émergentes, indépendantes de la communication jonctionnelle, sont aussi attribuées à la Cx43,

allant de la régulation de l'expression génique (Kardami *et al.*, 2007) à la modulation de la motilité cellulaire (Kameritsch *et al.*, 2012 ; Matsuuchi et Naus, 2013 ; Olk *et al.*, 2009).

Tout au long de son cycle de vie, la Cx43 est régulée à travers des modifications post-traductionnelles et/ou par des interactions protéine-protéine qui provoquent des changements dans sa conformation, son activité, sa charge, sa stabilité ainsi que sa localisation cellulaire (Dbouk *et al.*, 2009 ; Giepmans, 2004 ; Hervé *et al.*, 2007 ; Hervé *et al.*, 2012 ; Laird, 2010 ; Sosinsky et Nicholson, 2005). Ces interactions et/ou modifications se produisent essentiellement dans son domaine C-terminal (*Cx43CT*). En effet, l'extension importante de ce domaine (L228-I382), offre une surface potentielle à l'interaction de différents ligands intracellulaires. En outre, le domaine *Cx43CT* est le siège de nombreuses modifications comme la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (Johnstone *et al.*, 2012), ce qui lui permet de jouer un rôle crucial dans la fonction de cette connexine. Le domaine *Cx43CT* interagit avec de nombreuses enzymes ayant des activités kinase (*v-Src*), phosphatase (*RPTP*) ou ubiquitine ligase (*Nedd4*). Ce domaine interagit également avec les protéines structurales du cytosquelette (tubuline α/β , vimentine) ainsi qu'avec certaines protéines associées à l'actine (drébrine, spectrine) (Dbouk *et al.*, 2009 ; Giepmans, 2004 ; Hervé *et al.*, 2007 ; Hervé *et al.*, 2012 ; Laird, 2010 ; Olk *et al.*, 2009).

La détermination des éléments structuraux du domaine *Cx43CT* en interaction avec ces partenaires est indispensable pour une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de ces protéines. Dans cette étude, notre choix a porté sur la tubuline comme partenaire de la Cx43, compte tenu de l'importance de la tubuline et des microtubules au sein de la cellule et de l'impact cellulaire potentiel de cette association. En effet, beaucoup de travaux se sont intéressés à la fonctionnalité de l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules, qui semble avoir plusieurs points d'impact. Les microtubules semblent intervenir dans le trafic intracellulaire de la Cx43 où ils peuvent être nécessaires à un transport efficace des précurseurs de ces canaux jonctionnels jusqu'à la membrane plasmique (Johnson *et al.*, 2002 ; Lauf *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2001 ; Shaw *et al.*, 2007 ; Thomas *et al.*, 2001 ; Paulson *et al.*, 2000). L'interaction de la Cx43 avec les microtubules semble aussi nécessaire à la régulation de la voie de signalisation dépendant des Smad activée par le facteur de croissance TGF- β (Dai *et al.*, 2007 ; Dong *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 2004). Les facteurs de transcription Smad2 et Smad3 qui sont impliqués dans les cascades de transduction du signal induites par le TGF- β se lient à la tubuline par leur domaine *MH2* et semblent entrer en compétition avec la Cx43 pour leur liaison aux microtubules (Dai *et al.*, 2007). Ceci pourrait

fournir un mécanisme original de régulation de la voie de signalisation du *TGF-β* dépendant de la Cx43 (Dai *et al.*, 2007 ; Dong *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 2004). Des travaux récents suggèrent aussi que l'interaction de la Cx43 avec les microtubules pourrait être essentielle à certains processus cellulaires comme la polarisation et la migration cellulaire (Francis *et al.*, 2011). Il est bien établi que les microtubules définissent l'organisation interne des cellules en positionnant les organites et servent de rails pour le trafic vésiculaire, mais ces éléments du cytosquelette contrôlent également la motilité cellulaire (pour revue voir Kaverina et Straube, 2011). Ainsi, l'interaction des connexines avec ces éléments du cytosquelette pourrait permettre d'expliquer en partie le contrôle de la migration par la Cx43 (Hervé *et al.*, 2012 ; Kameritsch *et al.*, 2012 ; Laird, 2010 ; Olk *et al.*, 2009).

Bien que la structure moléculaire des canaux jonctionnels formés à partir de la Cx43 commence à être correctement cernée, les informations disponibles concernant la conformation du domaine C-terminal de la Cx43 restent encore limitées. Le domaine C-terminal de la Cx43 est essentiellement non structuré mais semble subir des transitions structurales suite à l'interaction de certains partenaires protéiques (Chen *et al.*, 2008 ; Kieken *et al.*, 2009) et/ou à la phosphorylation de certains de ses résidus sérine et/ou tyrosine (Grosely *et al.*, 2013b). La phosphorylation du domaine *Cx43CT* sur des résidus sérine et tyrosine est en effet impliquée dans la régulation de la perméabilité des jonctions communicantes formées à partir de cette connexine (Lampe *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2006 ; Solan et Lampe, 2009 ; Thévenin *et al.*, 2013 ; Warn-Cramer *et al.*, 1998). Ceci implique des changements conformationnels dépendant de la phosphorylation.

À ce jour, aucune analyse structurale n'a été réalisée sur le domaine C-terminal de la Cx43 en interaction avec le système tubuline/microtubules. Nous avons donc étudié ici pour la première fois, par spectroscopie RMN, les déterminants structuraux de cette interaction à travers l'analyse des propriétés conformationnelles de la région juxta-membranaire du domaine C-terminal de la Cx43 reconnue comme nécessaire et suffisante pour l'interaction avec le système tubuline/microtubules (Giepmans *et al.*, 2001b). Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un peptide, appelé dans ce travail K26D, qui correspond à la région K234-D259 du domaine juxta-membranaire de la Cx43. Nous nous sommes appuyés pour déterminer les limites de ce peptide sur des données expérimentales qui ont montré que ce domaine interagit directement avec la tubuline et les microtubules (Dai *et al.*, 2007 ; Giepmans *et al.*, 2001b). Il faut noter que cette région (K234-D259) contient deux sites de phosphorylation (tyrosine 247 et sérine 255) qui sont impliqués dans la régulation de la communication jonctionnelle. Le résidu Y247 est un site de phosphorylation par la protéine kinase *v-Src* (Lin *et al.*, 2001 ;

Lin *et al.*, 2006 ; Solan et Lampe, 2008), alors que le résidu S255 est un site de phosphorylation par les protéines kinases activées par des mitogènes MAPK et les kinases dépendantes des cyclines CDK1 (appelées auparavant CDC2) (Cameron *et al.*, 2003 ; Lampe *et al.*, 1998 ; Sirnes *et al.*, 2009 ; Warn-Cramer *et al.*, 1998).

L'étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules par les expériences RMN de différence de transfert de saturation (STD-NMR) a permis d'identifier les groupements chimiques de certains résidus du peptide K26D impliqués dans cette interaction. Il est intéressant de noter que le résidu Y247 qui représente un site de phosphorylation par la protéine kinase *v-Src* est impliqué dans cette interaction. Ce résultat suggère que l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules pourrait être régulée par des cycles de phosphorylation/déphosphorylation. Pour cela, nous avons entrepris d'étudier l'influence de la phosphorylation du résidu Y247 sur l'interaction de ce peptide avec la tubuline.

Enfin, pour progresser dans la compréhension de la compétition entre les facteurs de transcription Smad2/3 et la Cx43 pour leur liaison au système tubuline/microtubules, nous avons examiné la possibilité d'une compétition entre le peptide K26D et un autre peptide qui correspond à la séquence M416-T434 du domaine *MH2* des protéines Smad2 pour leur liaison à la tubuline.

Ce travail de thèse, qui a été effectué au sein du laboratoire SABNP à l'Université d'Évry-Val d'Essonne (France), a donné lieu à une publication (Saidi Brikci-Nigassa *et al.*, 2012) et s'articule selon quatre axes principaux :

- La caractérisation de l'interaction entre la région juxta-membranaire du domaine *Cx43CT* et le système tubuline/microtubules,
- La détermination des éléments structuraux de la région juxta-membranaire du domaine *Cx43CT* en interaction avec ces partenaires,
- La caractérisation de l'influence de la phosphorylation du résidu Y247 sur l'interaction de la région juxta-membranaire du domaine *Cx43CT* avec la tubuline,
- La caractérisation de l'interaction entre le domaine juxta-membranaire de *Cx43CT* et une région du domaine *MH2* de Smad2 pour leur liaison au système tubuline/microtubules.

Ce manuscrit commence par une introduction générale, présentant la problématique du sujet en détail, suivie de deux parties :

Dans la première partie, une synthèse bibliographique comporte trois chapitres :

Le chapitre I rassemble les connaissances actuelles concernant les connexines et les jonctions communicantes.

Le chapitre II regroupe la structure et la dynamique des microtubules ainsi que la fonctionnalité de l'interaction entre la Cx43 et les microtubules.

Le chapitre III traite l'analyse structurale par RMN d'un peptide en interaction avec une protéine.

La deuxième partie, expérimentale, se divise en trois chapitres :

Le chapitre IV aborde les différentes expériences effectuées au cours de ce travail.

Le chapitre V présente les résultats obtenus au cours de ce travail et leur interprétation.

Le chapitre VI regroupe tous les résultats dans une discussion globale.

Pour finir, une conclusion générale présente les perspectives ouvertes par ce travail.

Partie 1 :
Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Connexines & Jonctions

communicantes

1. Connexines : unités structurales des jonctions communicantes

1.1 Les connexines : une famille de protéines multigéniques

Les connexines (Cx) constituent les protéines structurales d'un type particulier de jonctions cellulaires appelées « jonctions communicantes ». Ces jonctions appelées aussi jonctions lacunaires, *macula communicans*, *nexus* ou *gap junction* (GJ) sont impliquées dans la communication intercellulaire.

Les connexines constituent une famille de protéines multigéniques avec 20 membres chez la souris et 21 isoformes chez l'homme dont 19 sont regroupés en paire d'orthologues (entre les deux espèces) (Sohl et Willecke, 2004). Les connexines présentent une forte homologie de séquence (50-80 % d'identité) (Goodenough *et al.*, 1996). Les différents membres de cette famille sont désignés le plus souvent par leur masse moléculaire prédite qui varie de 23 kDa (Cx23) à 62 kDa (Cx62) (Laird, 2006 ; Sohl et Willecke, 2004). On spécifie parfois l'espèce de laquelle ils proviennent par une lettre qui précède la masse moléculaire (Beyer *et al.*, 1987). Les connexines peuvent aussi être divisées en différents sous-groupes notés α , β et γ en s'appuyant sur leur identité de séquence, leur organisation topologique prédite (Kumar et Gilula, 1992) et la longueur de la boucle intracytoplasmique (Eiberger *et al.* 2001). En plus de la masse moléculaire, les connexines sont également désignées par *gap junction* suivi du sous-groupe auquel elles appartiennent en précisant l'ordre de découverte de la protéine dans le sous-groupe. Ainsi, le nom recommandé de la Cx43 est *Gap junction alpha-1 protein*. Les gènes des connexines sont désignés par GJ (*Gap Junction*), avec des lettres majuscules pour l'homme et des lettres minuscules pour la souris¹. Ainsi, le gène de la *mCx43* (Cx de 43 kDa chez la souris) et de son orthologue humain *hCx43* sont désignés par Gja1 et GJA1 respectivement, où le nombre 1 désigne la première connexine identifiée du groupe α (Sohl et Willecke, 2004).

La plupart des tissus des vertébrés expriment les connexines. Seuls quelques types cellulaires lorsqu'ils sont complètement différenciés (par exemple les globules rouges, les spermatozoïdes et le muscle squelettique) ne le font pas (pour revue, Saez *et al.*, 2003). Par ailleurs, plusieurs connexines peuvent être co-exprimées dans un même type cellulaire (Laird, 2006). Les connexines les mieux caractérisées sont la Cx43, la Cx32, et la Cx26 (Yeager, 1998). Parmi celles-ci, la Cx43 reste la mieux étudiée et la plus ubiquitaire dans les tissus de mammifères. La Cx43 est exprimée dans plus de 35 types cellulaires incluant les

¹ Pour le nom de la Cx43 et de ses gènes nous nous sommes conformés aux recommandations de la base de données UniProt (base de données qui présente des annotations précises des protéines : <http://www.uniprot.org>).

cardiomyocytes, les kératinocytes, les astrocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (**tableau 1.1**) (Laird, 2006; Willecke *et al.*, 2002).

Tableau 1.1 : Distribution tissulaire des connexines humaines et pathologies associées (d'après Willecke *et al.*, 2002)

Connexine	Expression majeure	Maladie(s) héréditaire(s) associée(s)
Cx25	n. a.	n. a.
Cx26	foie, sein, peau, cochlée, placenta.	surdité associée � une hyperkératose palmo-plantaire
Cx30	peau, cerveau, cochlée	forme non syndromique de surdité, dysplasie ectodermique hydrotique
Cx30,2	cellules myélinisées	n. a.
Cx30,3	peau	erythrokr�atodermie variable (EKV)
Cx31	peau, placenta	erythrokr�atodermie variable, détérioration de l'audition
Cx31,1	peau	n. a.
Cx31,9	n. a.	n. a.
Cx32	foie, cellules de Schwann et oligodentocytes	maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMTX) : neuropathie périphérique héréditaire
Cx36	neurones	n. a.
Cx37	endothélium	n. a.
Cx40,1	n. a.	n. a.
Cx40	cœur, endothélium	n. a.
Cx43	plusieurs types cellulaires	hétérotaxie visc�ro-atriale
Cx45	cœur, muscle lisse et neurones	n. a.
Cx46	cristallin	cataracte congénitale
Cx47	cerveau, moelle épinière	n. a.
Cx50	cristallin	cataracte zonulaire pulvérulente
Cx59	n. a.	n. a.
Cx62	ovaires	n. a.

n. a. : non analysé

1.2 Les connexines s'organisent en canaux jonctionnels intercellulaires

De nombreux travaux de prédiction ou expérimentaux ont été réalisés afin de déterminer l'organisation structurale des connexines au sein de la membrane tels que des analyses d'hydropathie, des comparaisons de séquences (Haefliger *et al.*, 1992 ; Beyer *et al.*, 1987), des digestions protéolytiques (Zimmer *et al.*, 1987) et les techniques d'immunomarquages (Milks *et al.*, 1988). Ces travaux ont conduit à l'élaboration d'un modèle topologique commun pour la famille des connexines.

Ce consensus fait apparaître les connexines comme des protéines membranaires polytopiques qui appartiennent à la famille des protéines appelées *tetraspan* de par la présence des quatre domaines transmembranaires de structure hélicoïdale (désignés par *M1*, *M2*, *M3* et *M4*) en partant de l'extrémité N-terminale (NT) vers l'extrémité C-terminale qui sont toutes les deux localisées sur la face cytoplasmique de la membrane. Le passage de ces domaines à travers la membrane expose deux boucles du côté extracellulaire et une du côté cytoplasmique (Goodenough *et al.*, 1996).

L'organisation des ces protéines monomériques en structure oligomérique a fait appel à d'autres investigations incluant la microscopie cryo-électronique et l'analyse du profil de diffraction électronique ou de rayons X (Makowski *et al.*, 1977 ; Oshima *et al.*, 2007 ; Maeda *et al.*, 2009 ; Unger *et al.*, 1997 ; Unger *et al.*, 1999). Ces travaux ont montré comment les connexines s'organisent en canaux jonctionnels dans la membrane plasmique. Les connexines s'oligomérisent d'abord en structure hexamérique appelée *connexon*. Ces structures oligomériques forment des hémi-canaux qui une fois livrés à la membrane plasmique peuvent s'unir tête-à-tête pour former des pores hydrophiles qui traversent les membranes des cellules voisines par interaction de leurs domaines extracellulaires (Makowski *et al.*, 1977). Les quatre régions transmembranaires sont formées d'hélice α (Unger *et al.*, 1999 ; Maeda *et al.*, 2009). Ces régions sont organisées de telle sorte que *M1* et *M2* tapissent l'intérieur du pore et que *M3* et *M4* forment l'extérieur de la paroi du canal face à la couche lipidique de la membrane (Maeda *et al.*, 2009). L'identité de l'hélice principale qui tapisse le pore a été controversée, certains travaux ont postulé que le domaine *M3*, qui a initialement été modélisé comme une hélice amphiphile, constitue l'hélice majeur qui tapisse le pore (Bennett *et al.*, 1991 ; Milks *et al.*, 1988 ; Skerrett *et al.*, 2002), alors que d'autres ont suggéré que c'était plutôt le domaine *M1* (Zhou *et al.*, 1997) (pour revue, Sosinsky et Nicholson, 2005 ; Yeager, 2009). L'étude de Maeda *et al.* (2009) a montré également que le domaine *M3* qui est très aromatique se positionne dans les sillons des domaines transmembranaires proches et que la moitié

extracellulaire des domaines *M2* et *M4* ainsi que les boucles extracellulaires seraient susceptibles de former des interfaces protéine-protéine.

Ces interfaces permettraient aux unités de connexine de s'oligomériser en connexons hexamériques par des interactions homomériques (même isotype) ou hétéromériques (isotypes différents), puisque ces régions contiennent la plupart des sites d'interaction des sous-unités connexine. Les deux boucles extracellulaires contiennent par ailleurs, chacune trois résidus cystéine (conservés dans toutes les connexines) qui forment des ponts disulfures intramoléculaires. Ces boucles semblent adopter une structure en tonneau β qui confère à ces domaines extracellulaires une conformation compacte et rigide leur permettant d'interagir étroitement avec les boucles extracellulaires des connexines de cellules adjacentes (Foote *et al.*, 1998). Cette étroite interaction assure l'étanchéité du canal jonctionnel en l'isolant de l'environnement extracellulaire (Saez *et al.*, 2003).

Nicholson (2003) a combiné dans la **figure 1.1** la séquence de la Cx32 à celle de la Cx43 afin de présenter les résidus qui sont fonctionnellement importants puisque ces deux connexines ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux. Les domaines transmembranaires, les boucles extracellulaires, le domaine N-terminal et la boucle intracellulaire appartiennent à la Cx32 alors que le domaine C-terminal est celui de la Cx43 (Sosinsky et Nicholson, 2005).

Les domaines transmembranaires, les boucles extracellulaires et le domaine N-terminal sont bien conservés. Par contre, le domaine C-terminal et la boucle intracytoplasmique sont très variables en longueur et en séquence entre les différentes isoformes (**tableau 1.2**) (Goodenough *et al.*, 1996; Haefliger *et al.*, 1992; Kumar et Gilula, 1996). Ces variations permettent de classer les connexines selon leur masse moléculaire. Elles procurent aussi une spécificité fonctionnelle des isotypes de par la présence de sites de phosphorylation et de sites de liaison pour les partenaires des connexines au niveau du domaine C-terminal (**figure 1.1**). Ces variations confèrent ainsi aux jonctions communicantes des propriétés de conductance et de perméabilité différentes selon l'isotype qui les compose.

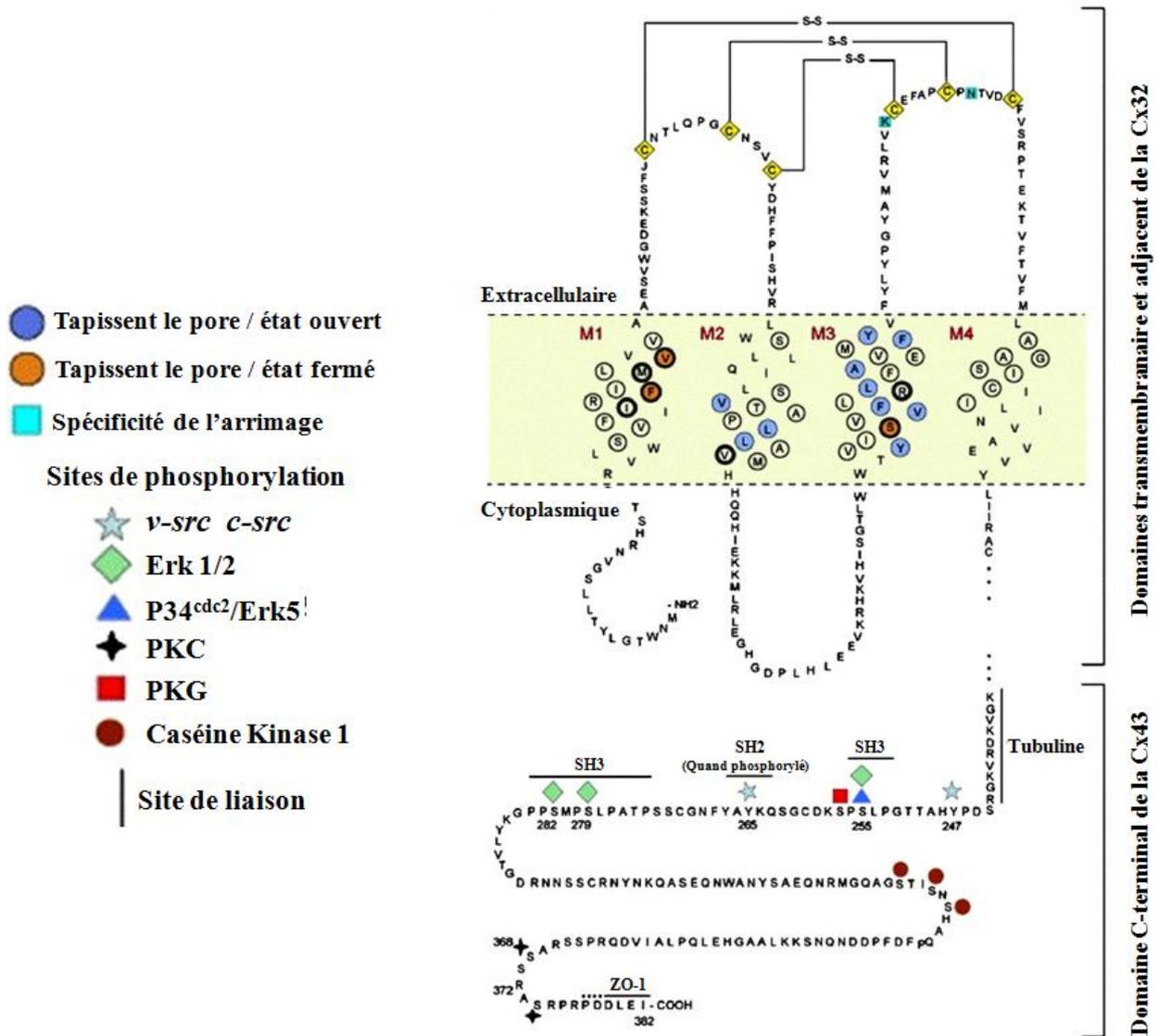


Figure 1.1 : Séquences combinées d'acides aminés pour la Cx32 et la Cx43 indiquant les résidus fonctionnellement importants

v-Src/c-Src : membres de la famille des kinases Src, **Erk1/2** et **Erk5** : membres de la famille des MAPK (*Erk* : *Extracellular signal-regulated kinases*), **P34^{cdc2}** : Kinase dépendante des cyclines², **PKC** : protéine kinase C, **PKG** : protéine kinase G.

Cette figure résume les résultats de différentes études montrant les sites de phosphorylation, les résidus qui tapissent le pore et les sites de liaison des partenaires protéiques cytoplasmiques.

Les résidus encerclés représentent les sites qui ont été substitués par la cystéine dans l'étude de Skerrett *et al.* (2002), les cercles en gras indiquent les résidus qui sont impliqués dans le contrôle de la conductance et la stabilisation des canaux à l'état fermé (Adapté de Nicholson, 2003) (Sosinsky et Nicholson, 2005).

² La protéine P34^{cdc2} est une protéine de 34 kDa codée par le gène *cdc2* (*Cell Division Control 2*) chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (homologue du gène *CDC2* chez l'homme). Le nom recommandé par UniProt pour P34^{cdc2} est CDK1 (*Cyclin-Dependent Kinase 1*).

Tableau 1.2 : Différences de longueur de la boucle cytoplasmique et du C-terminal de quelques connexines murines (d'après Willecke *et al.*, 2002)

Connexine	Sous-groupe	Protéine [aa]	Boucle cytoplasmique [aa]	C-terminal [aa]
Cx26	β	226	35	18
Cx29*	γ	258	30	50
Cx30	β	261	35	55
Cx30,3	β	266	30	65
Cx31	β	270	30	65
Cx31,1	β	271	30	70
Cx32	β	283	35	75
Cx33	α	283	55	60
Cx36*	δ	321	100	50
Cx37	α	333	55	105
Cx40	α	358	55	135
Cx43	α	382	55	155
Cx45	γ	396	80	150
Cx46	α	417	50	190
Cx47	γ	440	105	155
Cx50	α	440	50	210
Cx57	α	505	55	275

* : Les sous-groupes de la Cx29 et de la Cx36 ont été obtenus à partir de la base de données UniProt.

[aa] : Nombre d'acides aminés.

1.3 Les connexines : de la synthèse à la formation des plaques jonctionnelles

Les protéines oligomériques (récepteur de l'acétylcholine, aquaporine, protéines des jonctions serrées...) peuvent s'organiser de différentes manières au niveau de la membrane plasmique (Peng, 1983 ; Tsukita et Furuse, 1999 ; Yang *et al.*, 1996). Cependant, les canaux jonctionnels de structure dodécamérique qui résultent de l'arrimage de deux hémi-canaux se regroupent en un amas appelé plaque jonctionnelle (Ginzberg et Gilula, 1979 ; McNutt et Weinstein, 1970) qui peut s'étendre de quelques nanomètres à plusieurs micromètres de diamètre (McNutt et Weinstein, 1970). Cette plaque contient un nombre variable de canaux (moins d'une dizaine à plusieurs milliers d'unités). Ces derniers traversent les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes entraînant ainsi leur rapprochement et ne laissant qu'un espace intercellulaire de l'ordre du nanomètre (2 nm) appelé « gap » (**figures 1.2 et 1.3**).

La formation de ces canaux jonctionnels passe par plusieurs étapes et semble varier en fonction de l'isotype de connexine. Des expériences de fractionnement subcellulaire (Falk *et al.*, 1994 ; Musil et Goodenough, 1991) et d'immuno-colocalisation, (Laird *et al.*, 1995 ; Musil et Goodenough, 1991) ont révélé que la translocation des connexines jusqu'à la membrane plasmique (notamment pour la Cx43) emprunte la voie sécrétoire classique des protéines membranaires. Cependant, la Cx26 peut aussi emprunter une voie alternative plus rapide qui est indépendante de l'appareil de Golgi (Ahmad et Evans, 2002 ; George *et al.*, 1999 ; Martin *et al.*, 2001).

L'intégration co-translationnelle des connexines dans la membrane du réticulum endoplasmique s'effectue *via* son translocon. Les connexines adoptent à ce niveau leur conformation transmembranaire native en traversant la bicouche membranaire quatre fois et en exposant les domaines N- et C-terminaux du côté cytoplasmique (Falk et Gilula, 1998) et les boucles extracellulaires du côté luminal où la protéine disulfure-isomérase (PDI) forme des liaisons disulfures entre les cystéines de ces domaines (John et Revel 1991). Ensuite, ces protomères s'oligomérisent en structures hexamériques (connexons). (Goodenough *et al.*, 1996 ; Goodenough et Paul, 2009). Des connexons fonctionnels peuvent s'assembler dans la membrane du réticulum endoplasmique (Falk *et al.*, 1997) comme ceux formés à partir de la Cx26 et peuvent être importés directement dans la membrane plasmique (Ahmad et Evans 2002).

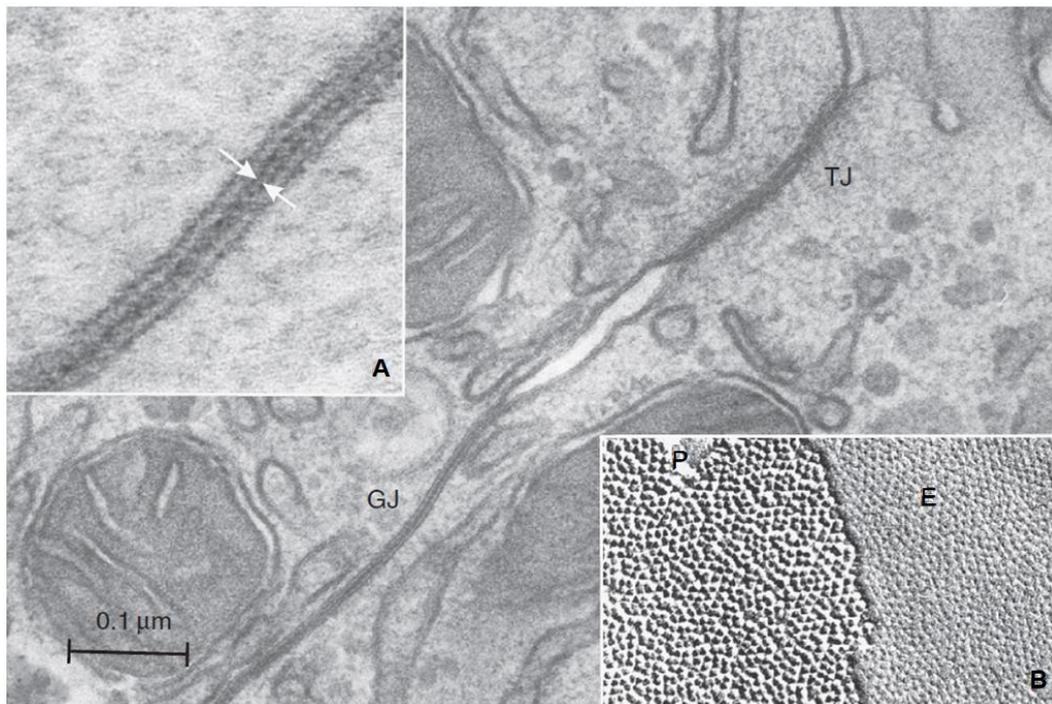


Figure 1.2 : Microscopie électronique d'une jonction communicante liant des hépatocytes adjacents chez la souris

La jonction communicante (*GJ* : *gap junction*) se présente comme une surface d'apposition des membranes plasmiques, elle est clairement différente de la jonction serrée (*TJ* : *tight junction*) joignant les cellules. (A) vue à haute résolution de la jonction communicante révélant un espace (*gap*) de 2 à 3 nm séparant les membranes plasmiques (flèches blanches). (B) Réplique obtenue par la technique de cryofracture d'une jonction communicante montrant les particules caractéristiques sur la face protoplasmique (P) de la fracture et des puits sur la face exoplasmique (E) d'après Goodenough et Paul (2009).

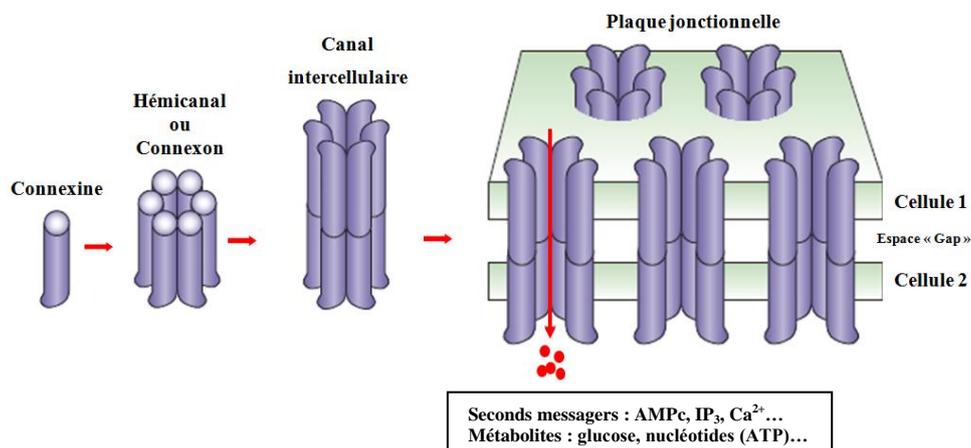


Figure 1.3 : Schéma montrant les multiples niveaux structuraux d'une jonction communicante

Les connexines individuelles s'assemblent en structures hexamériques, appelées *connexons*, qui sont transloqués à la surface cellulaire où ils s'assemblent en canaux traversant les deux membranes plasmiques qui permettent le passage (représenté par une flèche) d'un cytoplasme à un autre de petites molécules. L'espace intercellulaire est appelé *gap*. D'après Goodenough et Paul (2009).

Cependant, les Cx43 et Cx46 sont présentes sous forme monomérique dans l'appareil de Golgi et leur oligomérisation semble s'effectuer dans le réseau trans-golgien (Koval *et al.*, 1997 ; Musil et Goodenough, 1993). Les connexons (hémi-canaux) ainsi formés restent fermés afin de protéger et de maintenir l'intégrité de la lumière de ces compartiments intracellulaires et peuvent être homomériques ou hétéromériques (Laird, 2006).

Ces connexons sont ensuite transloqués *via* des vésicules de transport jusqu'à la membrane plasmique où ces vésicules fusionnent et délivrent leurs connexons dans une région de la membrane plasmique non jonctionnelle. Une fois insérés dans la membrane plasmique, les connexons semblent diffuser latéralement au sein de la bicouche lipidique pour atteindre la périphérie de la plaque jonctionnelle où ils s'arriment à d'autres connexons (Laird, 2006 ; Lauf *et al.*, 2002 ; Gaietta *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2005). D'autres études ont montré que la formation des jonctions communicantes est intimement liée à la formation des jonctions adhérentes (Meyer *et al.*, 1992 ; Wei *et al.*, 2005) et que les jonctions formées à partir de la Cx43 peuvent être directement livrées à la jonction adhérente comme cela a été suggéré par Shaw *et al.* (2007). Cependant, la Cx43 est aussi transportée vers des régions ne présentant pas de contact cellule-cellule comme les protrusions membranaires et où les hémi-canaux peuvent fonctionner indépendamment de la jonction communicante (Simek *et al.*, 2009).

Les connexines semblent être continuellement renouvelées pour répondre probablement aux besoins physiologiques de la cellule et se caractérisent par une demi-vie courte (1-5 h) (Beardslee *et al.*, 1998). Le recyclage se fait à partir du centre de la plaque jonctionnelle, les canaux sont marqués à l'ubiquitine et sont internalisés dans de grandes structures vésiculaires à doubles membranes et sont destinés à être dégradés par voie lysosomale ou par la voie du protéasome (Archard et Denys, 1979 ; Laing *et al.*, 1997 ; Laing et Beyer 1995 ; Leithe *et al.*, 2012 ; Leykauf *et al.*, 2006) (**figure 1.4**).

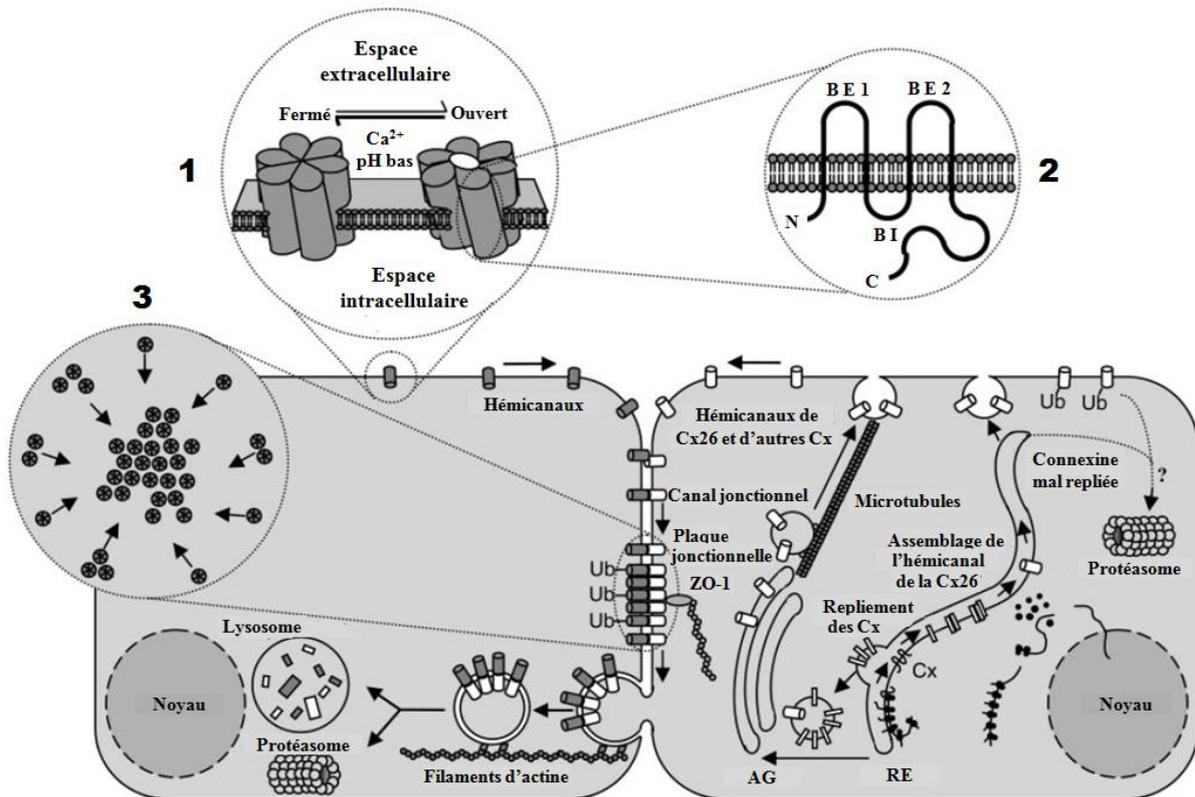


Figure 1.4 : Représentation schématique des étapes de biosynthèse, d'assemblage et de dégradation des canaux jonctionnels

L'ARNm quitte le noyau pour être traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux (RE). Les connexines (Cx) nouvellement synthétisées sont ensuite repliées et assemblées avec d'autres connexines dans des hémicanaux. Alors que la plupart des hémicanaux de la Cx26 et seuls quelques uns de la Cx43 sont insérés directement dans la membrane plasmique, la plupart des autres connexines, y compris la Cx43 et à une moindre mesure la Cx26, suivent la voie de sécrétion/exocytose c'est-à-dire qu'ils passent par l'appareil de Golgi (AG) et sont transportés dans des vésicules à la membrane plasmique le long des microtubules. Les hémicanaux peuvent rester à l'état libre à la surface cellulaire ou ils peuvent s'arrimer à d'autres hémicanaux au niveau de sites de contact cellule-cellule pour former des canaux jonctionnels. Les canaux jonctionnels peuvent se grouper pour former une plaque jonctionnelle. **1** : les hémicanaux sont à l'équilibre entre deux états conformationnels (ouvert et fermé). **2** : topologie des connexines au niveau de la membrane plasmique. **3** : Vue de face d'une plaque jonctionnelle en croissance GJ. Les canaux et hémicanaux des jonctions communicantes peuvent être ubiquitinylés (Ub). L'internalisation de la plaque jonctionnelle avec formation d'une structure annulaire est représentée sur la cellule de gauche. Cet anneau interagit avec les filaments d'actine et se déplace vers les lysosomes et les protéasomes où ses composants protéiques sont dégradés. Les connexines mal repliées ou les hémicanaux ubiquitinylés pourraient être dégradés par le protéasome et sont indiqués dans le coin supérieur droit de la cellule sur la droite d'après Saez *et al.* (2003).

N : extrémité N-terminale. C : extrémité C-terminale.

BE : boucle extracellulaire. BI : boucle intracellulaire.

Les connexines subissent certaines modifications post-traductionnelles au cours de la voie sécrétoire. Il semble que la Cx43 soit transitoirement phosphorylée tôt dans la voie sécrétoire (Laird *et al.*, 1995). Cependant, la grande majorité de la phosphorylation de la Cx43 se produit quand la connexine atteint la membrane plasmique (Lampe et Lau 2000 ; Lampe et Lau 2004). D'autres travaux ont aussi démontré que la Cx43 subissait également d'autres modifications comme l'ubiquitination (Laing et Beyer 1995) sur des résidus lysine (K9 et K303) (Wagner *et al.*, 2011). L'ubiquitine semble servir de marqueur dans la voie endocytaire de la Cx43 (Girão *et al.*, 2009). Les résidus lysine sont aussi des sites de conjugaison pour les protéines SUMO³ (*Small Ubiquitin-like Modifier*) et notamment les lysines (K144 et K237) de la Cx43 qui sont à proximité de la membrane (Kjenseth *et al.*, 2012).

Par ailleurs, il a été démontré que la Cx32 subit une modification post-traductionnelle qui est la prénylation sans que l'on comprenne aujourd'hui l'intérêt de cette modification puisque les connexines sont des protéines membranaires intégrales ne nécessitant pas d'ancrage lipidique (Huang *et al.*, 2005).

³ SUMO : famille de petites protéines apparentées à l'ubiquitine (Gareau et Lima, 2010).

2. Fonctions des jonctions communicantes

Le développement de modèles murins (souris knock-out) et l'étude des modifications phénotypiques des mutants de connexine identifiés chez l'homme ont démontré que le dysfonctionnement des jonctions communicantes est associé à de nombreuses maladies comme la neuropathie périphérique (CMTX), la cataracte congénitale, la surdité congénitale, des troubles dermatologiques, etc. (Willecke *et al.*, 2002) (cf. **tableau 1.1**). Ces travaux ont conduit par ailleurs à une meilleure compréhension des fonctions des connexines.

La principale fonction des connexines est reliée à leur propriété de former des canaux jonctionnels qui sont impliqués dans la signalisation paracrine en permettant un échange direct de molécules *via* ces canaux. En revanche, les héli-canaux « *extra-jonctionnels* » avant de former des canaux fournissent une voie de libération, dans le milieu extracellulaire, de certaines molécules comme l'ATP, le glutamate, l'IP₃, les prostaglandines ou le NAD⁺ (Goodenough et Paul, 2003 ; Goodenough et Paul, 2009). Ces molécules semblent agir comme des messagers paracrines qui sont impliqués dans la régulation de certains processus cellulaires tels que la croissance et la différenciation (Belliveau *et al.*, 2006). Il est bien établi que l'ATP libéré dans le milieu extracellulaire *via* les héli-canaux se fixe aux récepteurs purinergiques sur les cellules adjacentes et est essentiel à la propagation de la signalisation calcique intercellulaire (Evans *et al.*, 2006 ; Goodenough et Paul, 2003 ; Weissman *et al.*, 2004).

Par ailleurs, pour les canaux jonctionnels, en fonction de la nature des molécules échangées, on distingue le couplage ionique pour les cellules excitables du couplage métabolique pour la plupart des types cellulaires. Le couplage ionique (passage des ions) est indispensable au bon fonctionnement de plusieurs types cellulaires comme certaines cellules nerveuses, les cellules musculaires (cardiaques et lisses) et les cellules β pancréatiques. Le couplage de ces cellules excitables permet ainsi une synchronisation de la réponse cellulaire comme la contraction musculaire et la libération de l'insuline par les cellules β pancréatiques (Bennett et Zukin, 2004 ; Cao *et al.*, 1997 ; Oyamada *et al.*, 1994). Le couplage métabolique (diffusion des métabolites tels que l'AMPc, l'IP₃ et le Glucose) permet aux cellules (telles que les hépatocytes par exemple) de maintenir l'homéostasie tissulaire et de coordonner rapidement leur réponse aux stimuli (Pour revue (Goodenough et Paul, 2009 ; Saez *et al.*, 2003)).

En plus de leur faculté à fournir une communication directe entre les cellules couplées, les connexines (seules ou incorporées dans la plaque jonctionnelle) semblent être impliquées

dans d'autres processus incluant le contrôle de la croissance et du développement (Jiang et Gu, 2005 ; Kardami *et al.*, 2007). Le mécanisme par lequel les connexines influencent la croissance semble être relié à leur aptitude à exercer des effets sur l'expression génique, en particulier l'expression des gènes qui affectent la croissance. Le contrôle de l'expression des gènes semble impliquer deux mécanismes, (i) *un mécanisme canal-dépendant*, où la communication jonctionnelle est essentielle et permettrait d'échanger des seconds messagers qui pourraient moduler l'expression des gènes en altérant l'état de phosphorylation de certains facteurs de transcription dans les cellules couplées (Stains *et al.*, 2003 ; Stains et Civitelli, 2005), (ii) *un mécanisme connexine-dépendant mais canal-indépendant*, où plusieurs facteurs pourraient moduler l'expression génétique et où les connexines pourraient interagir et par conséquent séquestrer des molécules ayant une activité transcriptionnelle comme la caténine- β (Kardami *et al.*, 2007). Il semble que les interactions protéine-protéine susceptibles de moduler la croissance cellulaire pourraient aussi dépendre des modifications post-traductionnelles des connexines. Il a été démontré que la phosphorylation du résidu S262 du domaine C-terminal de la Cx43 élimine sa capacité à inhiber la croissance cellulaire (Dang *et al.*, 2006 ; Doble *et al.*, 2004). Il semble également que le domaine *Cx43CT* pourrait être suffisant pour diminuer la croissance cellulaire, et ceci indépendamment de la perméabilité jonctionnelle (Zhang *et al.*, 2003 ; Moorby et Patel, 2001). L'inhibition de la prolifération cellulaire pourrait aussi être au moins partiellement expliquée par la présence de certaines connexines ainsi que de leur domaine C-terminal dans le noyau comme cela été démontré pour le domaine C-terminal de la Cx43 (Dang *et al.*, 2003).

Il est aussi bien établi que les connexines possèdent également des fonctions qui peuvent être indépendantes de la formation des canaux et qui incluent le contrôle de la réorganisation du cytosquelette, de l'adhérence et de la migration cellulaire (pour revue (Matsuuchi et Naus, 2013 ; Olk *et al.*, 2009)).

De nombreux travaux ont démontré également que la Cx26, la Cx32 et la Cx43 jouent également un rôle important au cours de processus pathologiques comme le cancer, durant lequel elles semblent participer à la suppression tumorale (Qin *et al.*, 2002). Ces connexines semblent agir sur certains mécanismes caractéristiques de cette pathologie comme la croissance, la migration, l'invasion et le processus métastatique ainsi que sur la restauration de l'inhibition de contact (Sato *et al.*, 2007). La Cx26 semble agir sur l'adhérence cellulaire en régulant l'expression des gènes de l'intégrine- β 1 et des métalloprotéases matricielles (MMP) (Kalra *et al.*, 2006), alors que la Cx43 semble supprimer l'expression de la protéine

Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) qui est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire en favorisant la prolifération cellulaire (Zhang *et al.*, 2003).

En plus des effets connus de la Cx43, cette protéine assure probablement d'autres fonctions qui sont encore inconnues puisqu'en plus de sa localisation membranaire, la Cx43 a été localisée aussi dans le noyau et dans les mitochondries. Ainsi, la structure quaternaire, les interactions moléculaires et les fonctions de cette connexine à ces localisations requièrent davantage d'investigations (Dang *et al.*, 2003 ; Dbouk *et al.*, 2009 ; Goubaeva *et al.*, 2007 ; Rodriguez-Sinovas *et al.*, 2007 ; Ruiz-Meana *et al.*, 2008).

3. Régulation de la communication jonctionnelle

La communication intercellulaire à travers les canaux jonctionnels est passive mais elle reste dépendante du nombre de canaux présents dans la membrane plasmique ainsi que de leur état fonctionnel. La perméabilité jonctionnelle est finement régulée par des phénomènes de phosphorylation et de déphosphorylation des connexines ainsi que par plusieurs autres facteurs parmi lesquels figurent la concentration en calcium (Ca^{2+}) et en protons (H^+) et la différence de potentiel transmembranaire au niveau des jonctions. Ces facteurs semblent agir en provoquant des changements conformationnels de certains domaines des connexines ainsi qu'en modifiant leur interaction.

Les concentrations efficaces à la fois de Ca^{2+} et de H^+ varient selon le type de cellule et le type de connexine exprimée. Les travaux de Zhou *et al.* (2007) ont démontré que la calmoduline se lie à la Cx43 de façon Ca^{2+} dépendante et que cette interaction pourrait expliquer l'inhibition des jonctions communicantes formées à partir de la Cx43 induite par le Ca^{2+} (Peracchia, 2004). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que les pH acides induisent des modifications structurales de la boucle intracytoplasmique et du domaine C-terminal de la Cx43, nécessaires à leur interaction. Ces interactions pourraient expliquer la fermeture des pores jonctionnels en réponse à la baisse du pH (Duffy *et al.*, 2002 ; Morley *et al.*, 1996 ; Hirst-Jensen *et al.*, 2007).

De plus, des différences importantes de potentiel transmembranaire à travers la jonction semblent contrôler la conductance et la perméabilité de la jonction communicante en fermant les canaux probablement par interaction du domaine C-terminal avec une région du pore (Anumonwo *et al.*, 2001).

Par ailleurs, de nombreux travaux ont démontré que la modulation de la communication intercellulaire des jonctions communicantes est corrélée avec la phosphorylation d'un ou de plusieurs résidus spécifiques sérine (S) et tyrosine (Y) (Le et Musil, 2001). Ces sites de phosphorylations sont localisés principalement dans le domaine C-terminal des connexines (Lampe et Lau, 2000) ou exceptionnellement dans la boucle cytoplasmique pour certaines connexines comme la Cx36 (Urschel *et al.*, 2006).

Pour la Cx43, tous les sites de phosphorylation (15 sites) connus se trouvent au niveau de son domaine C-terminal (**tableau 1.3**) (Thévenin *et al.*, 2013). Ces phosphorylations sont régulées par différentes voies de signalisation impliquant des sérine/thréonine kinases telles que la famille des MAPK (Cameron *et al.*, 2003 ; Sirnes *et al.*, 2009 ; Warn-Cramer *et al.*, 1996 ; Warn-Cramer *et al.*, 1998) et la protéine kinase C (PKC) (Reynhout *et al.*, 1992 ; Sáez

et al., 1997) et des tyrosine kinases comme les kinases de la famille Src (Lin *et al.*, 2001) (Thévenin *et al.*, 2013). Il semble que ces trois voies de signalisation contribuent ensemble à la régulation de la jonction communicante durant la transformation des cellules par v-Src (Pahujaa *et al.*, 2007 ; Solan et Lampe, 2008 ; Solan et Lampe, 2009). Les protéines phosphatases déphosphorylent les connexines phosphorylées afin de réguler leur activité (Ai et Pogwizd, 2005).

Tableau 1.3 : Sites de phosphorylation de la Cx43 (d'après Thévenin *et al.*, 2013)

Résidu	Kinase	Effet régulateur
Y247, Y265	v-Src/c-Src	Altération de la CJI, fermeture du canal
S255, S262	MAPK/CDK1	Altération de la CJI, fermeture du canal
S279, S282	MAPK	Altération de la CJI, fermeture du canal
S368	PKC	Altération de la CJI, fermeture du canal
S325, S328, S330	CK1	Assemblage de la plaque jonctionnelle
S364, S365	PKA	Trafic vers la membrane plasmique
S369*	Akt/PKA	-
S372*	PKC	-
S373	Akt/PKA	Trafic vers le Golgi et la membrane plasmique Altération de l'interaction avec la protéine ZO-1 Favorise l'interaction avec la protéine 14-3-3

CJI : Communication jonctionnelle intercellulaire, **v-Src/c-Src** : Membres de la famille des kinases Src⁴, **MAPK** : Protéines kinases activées par des mitogènes, **CDK1** : kinases dépendantes des cyclines, **PKC** : protéine kinase C, **CK1** : Caséine Kinase 1, **PKA** : Protéine kinase A, **Akt** : Kinase appelée aussi protéine kinase B, ou PKB.

S369* et S372* se sont révélées être phosphorylées *in vitro*. L'effet régulateur de ces événements de phosphorylation n'a pas été démontré *in situ*.

⁴ Dans la famille Src, on distingue le gène viral V-SRC du virus du Sarcome de Rous de son homologue cellulaire le gène SRC, ces gènes codent les protéines kinases appelées *Tyrosine-protein kinase transforming protein Src* (v-Src) et *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src* (p60-Src), respectivement (notations selon les recommandations de la base de données UniProt).

La protéine kinase p60-Src est aussi désignée par Proto-oncogene c-Src ou c-Src.

Chapitre II :
Interaction de la Cx43 avec
la tubuline et les
microtubules

1. Tubulines : unités structurales des microtubules

Les microtubules (MT) apparaissent en microscopie électronique comme de longs cylindres creux rectilignes. Ils constituent un élément majeur du cytosquelette de par leur importance fonctionnelle et structurale et sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Ils sont essentiels à de nombreuses fonctions cellulaires, principalement d'ordre structural, telles que la motilité et la division cellulaire, en formant des structures subcellulaires comme les cils/flagelles et le fuseau mitotique, la morphogénèse puisqu'ils assurent le maintien de la position et de la forme de certains organites (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique) et le transport vésiculaire, en fournissant des rails aux protéines motrices.

Les microtubules sont des fibres polaires car ils présentent deux extrémités non équivalentes, notées extrémité (+) et extrémité (-), pour croissance rapide et croissance lente, respectivement. Dans les cellules animales, l'extrémité (-) des microtubules est ancrée le plus souvent dans un centre organisateur des microtubules (*MTOC* pour *MicroTubule-Organizing Center*). Le centrosome, situé près du noyau dans les cellules interphasiques, est un MTOC et constitue le site majeur de nucléation des microtubules. Par contre, l'extrémité (+) est orientée vers la périphérie de la cellule (membrane plasmique) (Nakajima *et al.*, 2004).

Les microtubules sont des fibres protéiques creuses de 25 nm de diamètre externe formées par un assemblage parallèle et avec la même polarité de polymères linéaires appelés protofilaments. Dans la plupart des cellules eucaryotes, les microtubules résultent de l'association latérale de treize protofilaments (**figure 2.1**) (Tilney *et al.*, 1973). Chez les Nématodes, ce nombre varie de onze à quinze (Fukushige *et al.*, 1999).

Les protofilaments sont formés par un auto-assemblage orienté (tête-à-queue) d'une protéine globulaire appelée tubuline. Cette protéine, très conservée à travers les espèces, existe sous différentes isoformes dont le nombre augmente avec la complexité de l'organisme. Ainsi, les eucaryotes supérieurs ont jusqu'à sept isotypes β (tubuline- β) et six isotypes α (tubuline- α). La tubuline formant les microtubules est un hétérodimère de tubuline- α et de tubuline- β . Ces deux monomères possèdent une masse moléculaire d'environ 55 kDa et sont étroitement apparentés (avec 63 % d'homologie) et étroitement liés. Une troisième isoforme plus rare appelée tubuline- γ est aussi retrouvée dans les cellules eucaryotes. La tubuline- γ est impliquée dans la nucléation des microtubules dans les MTOC. Des isoformes supplémentaires de tubuline ont été identifiées mais restent encore mal définies (Nogales, 2004).

Une première structure à basse résolution de la tubuline a été obtenue par cristallographie électronique réalisée sur des feuillets bidimensionnels de tubuline induits par le Zn^{2+} et stabilisés par le Taxol (Nogales *et al.*, 1998b). L'étude de la structure de l'homologue monomérique bactérien de la tubuline appelé *protéine FtsZ* par radiocristallographie aux rayons X a également participé à résoudre partiellement cette structure (Löwe et Amos, 1998 ; Nogales *et al.*, 1998a). La structure de la tubuline à haute résolution a pu être obtenue par radiocristallographie aux rayons X à partir de 2000 (Gigant *et al.*, 2000 ; Ravelli *et al.*, 2004 ; Gigant *et al.*, 2005). Cette avancée majeure a été rendue possible par la capacité des complexes stathmine-tubuline de cristalliser. De nos jours, la structure de tels complexes est résolue à 2,1 Å (Nawrotek *et al.*, 2011). La tubuline comporte trois domaines fonctionnels distincts. Dans le domaine N-terminal, des brins β alternent avec des hélices α en formant un repliement de type *Rossmann-fold*, typique des protéines fixant les nucléotides (Rossmann *et al.*, 1974). Le domaine intermédiaire contient des feuillets β entourés d'hélices. Le domaine C-terminal comporte deux longues hélices qui chevauchent les deux domaines précédents. Chaque monomère de la tubuline s'associe à un nucléotide à guanine (GTP), mais seule la tubuline- β peut l'hydrolyser et échanger son produit d'hydrolyse (GDP).

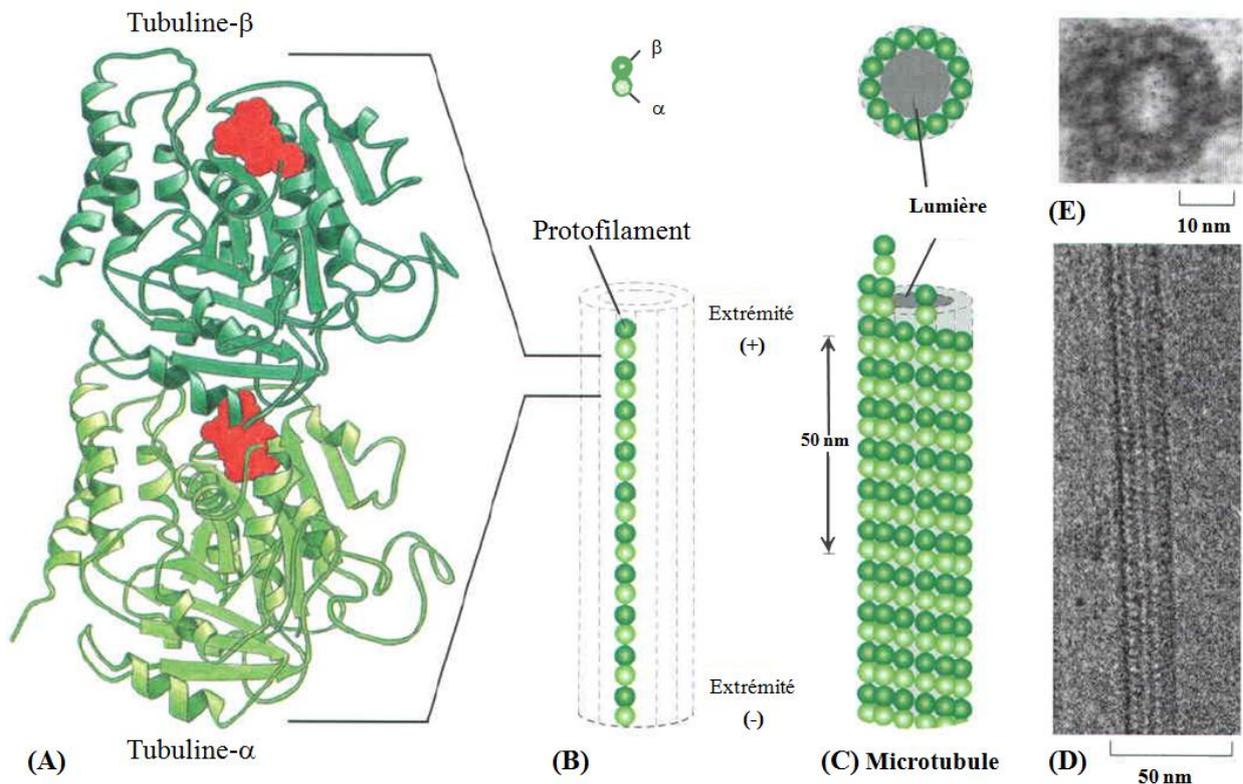


Figure 2.1: Structure d'un microtubule et de ses sous-unités

(A) La sous-unité de chaque protofilament est un hétérodimère de tubuline α et β . Le GTP apparaît en rouge. (B) Représentation schématique d'un hétérodimère et d'un protofilament. (C) Le microtubule (MT) est un tube creux rigide formé de 13 protofilaments alignés parallèlement. (D) Court segment de MT vu en microscopie électronique. (E) Photographie en microscopie électronique d'une coupe transversale d'un MT montrant un anneau de 13 protofilaments distincts (Alberts *et al.*, 2004).

La majorité des différences entre les isotypes de la tubuline est localisée dans le domaine C-terminal. Ce domaine riche en résidus à caractère acide (Glu) est le site d'interaction de nombreuses protéines, comme les protéines associées aux microtubules (*MAP* pour *Microtubule-Associated Proteins*), abondamment exprimées dans les neurones. Ces MAP présentent plusieurs séquences répétées riches en résidus basiques (Lys-Lys-Glu-X) importantes pour leur interaction aux microtubules (Hirokawa et Takemura, 2004). Le domaine C-terminal de la tubuline peut subir un grand nombre de modifications post-traductionnelles telles que la détyrosination (retrait du résidu tyrosine en position C-terminale de la tubuline- α), la polyglutamylation et la polyglycylation (génération de longues chaînes latérales de glutamate et de glycine, respectivement, de la tubuline α/β) (Verhey et Gaertig, 2007).

Par ailleurs, l'insertion du modèle atomique de la tubuline résolu par cristallographie dans la carte de densité électronique des microtubules obtenue par microscopie cryoélectronique a permis l'obtention d'un modèle atomique du microtubule. Ce modèle a permis de déterminer les parties de tubulines impliquées dans les interactions latérales entre les protofilaments qui sont responsables de la stabilité des microtubules. Ce modèle a permis également d'étudier les interfaces intra- et inter-dimère ce qui a permis de situer le site de liaison du GTP qui est indispensable à la dynamique des microtubules. Ainsi, l'extrémité (+) du microtubule est coiffée par la tubuline- β alors que l'extrémité (-) est coiffée par la tubuline- α . Chaque nucléotide lié à la tubuline se trouve à l'interface α - β dans le protofilament mais présente des différences en fonction de l'isotype. Pour la tubuline- β , le GTP hydrolysé en GDP reste lié à son site de fixation car sa position à l'interface α - β empêche son échange jusqu'au désassemblage du protofilament. Par contre, le GTP de la sous-unité α , qui est non hydrolysable et non échangeable, permet à cette interface de rester intimement liée même quand l'hétérodimère est libéré du protofilament. De plus, dans ce modèle, les hélices du domaine C-terminal forment des crêtes à la surface du protofilament, ce qui explique leur interaction avec les protéines MAP (Amos et Schlieper, 2005 ; Li *et al.*, 2002 ; Nogales *et al.*, 1999).

2. Microtubules : éléments instables et dynamiques

Dans la cellule, les microtubules ne forment pas uniquement des structures statiques mais peuvent osciller entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation. Ce comportement oscillatoire, appelé *instabilité dynamique*, nécessite la liaison et l'hydrolyse du GTP (Alushin *et al.*, 2014 ; Mitchison et Kirschner, 1984). Il s'accommode aux besoins de la cellule en interphase et durant le cycle cellulaire. La régulation de la dynamique des microtubules est essentielle pour permettre d'assurer diverses fonctions cellulaires, allant de la division cellulaire et la migration à la différenciation cellulaire. Cette régulation implique l'existence dans la cellule d'une variété de facteurs protéiques pouvant altérer la croissance et la stabilité des microtubules ainsi que leurs associations avec d'autres structures cellulaires (Desai et Mitchison, 1997 ; Cassimeris, 1999 ; Tran *et al.*, 1997). Les protéines stabilisatrices des microtubules sont essentiellement représentées par la famille de protéines associées aux microtubules (MAP1, MAP2, MAP4 et tau). Les protéines MAP citées ci-dessus se lient classiquement à la paroi des microtubules mais certaines protéines MAP (CLIP-170, EB1,

etc.)⁵, appartenant à la famille des protéines +*TIP* (*plus-end tracking proteins*), ciblent plutôt l'extrémité (+) croissante du microtubule (Perez *et al.*, 1999). La liaison de ces protéines MAP aux microtubules est contrôlée par des kinases et des phosphatases (Cassimeris et Spittle, 2001).

Par ailleurs, d'autres protéines sont capables de déstabiliser les microtubules par différents mécanismes moléculaires. Les protéines de la famille de la stathmine forment un complexe de séquestration réversible avec la tubuline (complexe T2S) dont la stabilité est régulée par phosphorylation de la stathmine. Au-delà de la séquestration de la tubuline qui conduit à la diminution du nombre de microtubules dans la cellule, ces protéines augmentent indirectement la fréquence des *catastrophes* (décroissances rapides) et pourraient aussi déstabiliser directement les microtubules par interaction avec l'extrémité (-) (Manna *et al.*, (2006).

La katanine et ses protéines apparentées comme la spastine sont capables de découper les microtubules par la rupture des liaisons entre les sous-unités de tubuline dans la paroi du microtubule (Baas *et al.*, 2005 ; Roll-Mecak et McNally, 2010). Plusieurs membres de la famille des kinésines, qui sont des protéines motrices, sont aussi impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules. Ainsi, la kinésine associée au centromère mitotique MCAK (*Mitotic Centromere Associated Kinesin*), un membre de la sous-famille des kinésines-13, favorise le désassemblage des microtubules à l'extrémité (+) (Cassimeris, 1999 ; Hunter *et al.*, 2003 ; Kline-Smith et Desai, 2004 ; Moore *et al.*, 2005).

L'activité de ces facteurs protéiques impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules est modulée pour la plupart par des cycles de phosphorylation/déphosphorylation. Par ailleurs, il a été démontré par des travaux récents que certaines modifications post-traductionnelles de la tubuline pouvaient aussi moduler cette activité. Ainsi, la polyglutamylatation (génération de longues chaînes latérales de glutamate) favorise la rupture des microtubules par la spastine (Lacroix, 2010). La détyrosination des microtubules (retrait du résidu tyrosine en position C-terminale de la tubuline- α) supprime l'activité de la kinésine MCAK (Peris *et al.*, 2009), alors que la présence du résidu tyrosine en position C-terminale de la tubuline- α favorise l'interaction de la protéine CLIP-170 au bout (+) des microtubules (Bieling *et al.*, 2008 ; Peris *et al.*, 2006).

⁵ CLIP-170 : protéine de 170 kDa appartenant à la famille des protéines CLIP (*cytoplasmic linker protein*).
EB1: *Microtubule end-binding protein 1*.

3. Microtubules : partenaires de la connexine43

Les interactions protéine-protéine (IPP) constituent les éléments clés dans la formation de complexes protéiques fonctionnels indispensables à la régulation de différents processus cellulaires impliqués dans le contact cellule-cellule, les cascades de signalisation, le contrôle de l'expression des gènes, l'édification d'assemblage supramoléculaire, l'activité enzymatique, etc. Une partie des domaines transmembranaires et les boucles extracellulaires des connexines interagissent exclusivement avec d'autres connexines pour permettre l'oligomérisation et l'arrimage des connexons. Par contre, le domaine C-terminal reconnaît différents partenaires protéiques. L'extension importante de ce domaine et notamment de celui de la Cx43, qui fait environ 17 kDa (L228-I382), offre une surface potentielle à l'interaction avec ces partenaires (cf. **figure 1.1**) qui semblent agir à différents stades en régulant l'oligomérisation des connexines, le trafic des connexons, la perméabilité de la plaque jonctionnelle ainsi que l'internalisation de ces canaux (Dbouk *et al.*, 2009 ; Giepmans, 2004 ; Hervé *et al.*, 2007 ; Hervé *et al.*, 2012 ; Laird, 2010).

Les partenaires de la Cx43 sont variés par leurs fonctions et structures. Les protéines structurales des jonctions adhérentes et serrées, cadhérines et occludines/cludines (Nagasawa *et al.*, 2006) ainsi que leurs protéines adaptatrices caténine- β (Ai *et al.*, 2000) et *Zonula occludens* (ZO) (Giepmans et Moolenaar, 1998 ; Toyofuku *et al.*, 1998), respectivement, se sont révélées interagir avec cette connexine. Le rôle de l'interaction des protéines ZO avec la Cx43 n'est pas bien élucidé. Cependant, de nombreux travaux ont été réalisés sur l'interaction de la protéine *Zonula occludens-1* (ZO-1) avec la Cx43. Cette protéine d'échafaudage semble coordonner l'assemblage de complexes multiprotéiques sur les plaques jonctionnelles de la Cx43 en recrutant des protéines impliquées dans la voie endocytaire dépendant de la clathrine ou des enzymes comme les kinases et l'ubiquitine ligase nécessaires à la régulation de ces plaques (Thévenin *et al.*, 2013).

Par ailleurs, d'autres études ont démontré que les cadhérines-N et les Cx43 sont co-assemblées dans des complexes multiprotéiques contenant de nombreuses protéines associées aux cadhérines-N, ce qui suggère une interdépendance entre les jonctions adhérentes et communicantes (Wei *et al.*, 2005). D'autre part, l'étude de Govindarajan *et al.* (2010) a montré que l'effet des cadhérines sur la formation de la jonction communicante peut être controversé, puisque l'expression des cadhérines-N atténue l'assemblage de la Cx43 en jonctions communicantes alors que l'expression des cadhérines-E le facilite.

En outre, la Cx43 agit comme un substrat de plusieurs protéines kinase. Sa phosphorylation peut altérer sa localisation subcellulaire et l'activité des canaux jonctionnels formés à partir de cette connexine et moduler son interaction avec d'autres macromolécules (cf. **tableau 1.3**) (Hervé *et al.*, 2012 ; Thévenin *et al.*, 2013).

L'inhibition de la communication des canaux jonctionnels (formés à partir de la Cx43) par les protéines kinase de la famille *Src* semble impliquer une interaction directe entre la Cx43 et ces kinases. Les domaines impliqués dans cette interaction sont bien établis pour la protéine kinase v-*Src* ; le domaine *Src homology3 (SH3)* se fixe sur une région riche en proline (P274-P284) de la Cx43, permettant au domaine kinase de phosphoryler le résidu Y265 qui devient alors un site d'interaction pour le deuxième domaine *Src homology2 (SH2)* de la protéine kinase v-*Src*. Ceci permet de stabiliser l'interaction entre la Cx43 et la protéine kinase (Giepmans *et al.*, 2001a ; Kanemitsu *et al.*, 1997) qui va par la suite phosphoryler le résidu Y247 (Lin *et al.*, 2001 ; Warn-Cramer et Lau 2004). La phosphorylation de ces deux résidus (Y247 et Y265) est corrélée à l'inhibition de la communication des canaux jonctionnels (formés à partir de la Cx43) (Lin *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2006 ; Solan et Lampe, 2008).

Les connexines sont aussi capables d'interagir avec les éléments du cytosquelette ou avec leurs protéines associées. De nombreuses études ont démontré une colocalisation de la Cx43 avec les microfilaments liée à une interaction directe ou indirecte *via* les protéines associées aux microfilaments comme la *drébrine*⁶ qui interagit directement avec la Cx43 (Butkevich *et al.*, 2004). Les travaux de Giepmans *et al.* (2001b) et Dai *et al.* (2007) ont montré que la Cx43 est capable d'interagir de manière directe avec la tubuline et les microtubules *via* le domaine juxta-membranaire (L228-C260) de sa région C-terminale.

De nombreux travaux ont été réalisés pour tenter d'expliquer la fonctionnalité de cette interaction en utilisant la Cx43 marquée par la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et des molécules altérant la dynamique des microtubules, comme le nocodazole qui inhibe leur polymérisation (Johnson *et al.*, 2002 ; Lauf *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2005). Les microtubules se sont révélés être nécessaires pour un transport efficace de la Cx43 entre le réseau transgolgien et la membrane plasmique. Shaw *et al.* (2007) ont montré que les protéines EB1 (+*TIP*) ciblent les connexons contenant la Cx43 à la jonction adhérente. Ces auteurs proposent un modèle par lequel les microtubules s'arriment à la jonction adhérente *via* un complexe protéique impliquant EB1, la protéine Glued p150 du

⁶ *Drebrin* : *Developmentally-regulated brain protein*.

complexe dynéine-dynactine et la caténine- β . C'est ainsi que le transport des connexons de la Cx43 aboutit à la jonction adhérente (**figure 2.2**). Par contre, les résultats de Lauf *et al.* (2002) et Thomas *et al.* (2005) montrent que la livraison des connexons formés à partir de la Cx43 se fait de façon aléatoire dans des régions non jonctionnelles. Bien que le transport antérograde des vésicules le long des microtubules est généralement assuré par des protéines motrices (*kinésines*), l'implication de celles-ci dans le trafic des connexines n'a été démontrée qu'*in vitro* et *in cellulo* pour la Cx32 (Fort *et al.*, 2011).

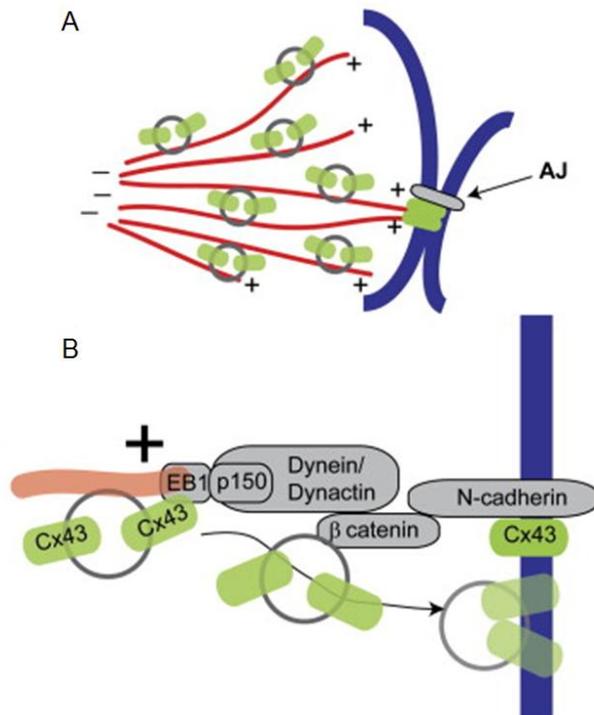


Figure 2.2 : Les plaques des jonctions communicantes dépendent des interactions homophiliques des cadhérines

(A) La capture corticale des microtubules par les jonctions adhérentes (AJ) permet de localiser l'insertion des héli-canaux de la Cx43 dans la membrane plasmique, alors que les microtubules ne parviennent habituellement pas à atteindre la membrane cellulaire sans la jonction adhérente.

(B) Du microtubule à la cadhérine, la capture corticale et la livraison de la Cx43 implique les intermédiaires suivants : EB1, la protéine Glued p150 du complexe dynéine-dynactine, et la caténine- β , comme cela a été révélé par « knock-down » de ces protéines et par co-immunoprécipitation de EB1 et de la Cx43. Ce résultat localise la livraison des héli-canaux de la Cx43 directement aux plaques de contact cellule-cellule (Shaw *et al.*, 2007).

En outre, l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules semble aussi avoir un impact sur la migration cellulaire. En plus de la fonction principale de la Cx43 qui est sa capacité à former des canaux permettant la communication intercellulaire, de nouvelles fonctions sont attribuées à cette connexine qui semble agir aussi comme un régulateur de la morphologie cellulaire, de la polarité, de l'adhérence et de la migration cellulaire (pour revue, Matsuuchi et Naus, 2013). Il est bien établi que les différents éléments du cytosquelette et les molécules d'adhérence cellulaire (CAM) sont essentiels au maintien de la polarité, à l'adhérence et à la migration cellulaire. Le mécanisme exact de contrôle de ces processus par les connexines n'est pas clair. Cependant, l'interaction des connexines avec certains modulateurs de ces processus pourrait présenter un moyen plausible pour expliquer ce contrôle. Différentes molécules qui jouent le rôle de modulateurs interagissent avec la Cx43 : (i) *des molécules d'adhérence cellulaire* comme les cadhérines et les intégrines, (ii) *des éléments du cytosquelette* comme les microfilaments, les filaments intermédiaires (vimentine) et les microtubules, (iii) *des protéines associées aux microfilaments* comme la cortactine, la débrine et la spectrine (Elias *et al.*, 2007 ; Hervé *et al.*, 2012 ; Kameritsch *et al.*, 2012 ; Laird, 2010 ; Olk *et al.*, 2009). Ainsi, l'étude de Francis *et al.* (2011) s'est focalisée sur le mécanisme par lequel la Cx43 régule la polarité cellulaire. Ces auteurs postulent que l'interaction de la Cx43 *via* son domaine juxta-membranaire (234-243) avec les microtubules pourrait être essentielle à la stabilité des microtubules nécessaire à la polarisation et à la migration cellulaire. D'autres travaux suggèrent que l'interaction de la Cx43 avec les microtubules pourrait servir à stabiliser l'extrémité (+) des microtubules au niveau de la jonction communicante (Giepmans *et al.*, 2001b ; Guo *et al.*, 2003). Ces postulats permettent d'attribuer de nouvelles fonctions à cette interaction.

Par ailleurs, diverses techniques de biochimie et de biologie cellulaire ont tenté d'expliquer le rôle de l'interaction de la Cx43 avec les microtubules dans la régulation de la voie de signalisation dépendant des Smad activée par le facteur de croissance TGF- β ⁷ (Dai *et al.*, 2007 ; Dong *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 2004). Ce facteur est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire et la mort cellulaire. L'activation de cette voie de signalisation implique deux classes fonctionnelles de la famille Smad (facteurs de transcription) appelées R-Smad (Smad2 et

⁷ La superfamille des TGF- β est composée d'un grand nombre de protéines dimériques, elle comprend la famille des TGF- β /activine et la grande famille des protéines impliquées dans la morphogénèse osseuse (BMP, *bone morphogenetic proteins*).

Smad3)⁸ et Co-Smad (Smad4). La transduction du signal porté par le TGF- β implique la phosphorylation des R-Smad par les récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase, la formation de complexes oligomériques (R-Smad phosphorylé:Co-Smad) et la translocation de ces complexes au noyau où ils vont réguler la transcription de gène cible. La structure en domaines des protéines Smad représentée dans la **figure 2.3** montre la présence de deux domaines, *MH1* (*Mad homology1*) à l'extrémité N-terminale et *MH2* (*Mad homology2*) à l'extrémité C-terminale, séparés par un *linker*. Le domaine *MH2* est impliqué dans des interactions protéine-protéine qui permettent de réguler l'oligomérisation des Smad, leur reconnaissance par les récepteurs sérine/thréonine kinase et leur interaction avec des adaptateurs cytoplasmiques et plusieurs facteurs de transcription. Le domaine *MH1* interagit également avec des partenaires protéiques mais se caractérise par sa liaison à l'ADN (Derynck et Zhang, 2003 ; Heldin et Moustakas, 2012 ; Massagué et Wotton, 2000 ; Moustakas *et al.*, 2001).

Certains travaux ont démontré que les microtubules interagissent avec les protéines Smad2, Smad3 et Smad4. Ils suggèrent que ces éléments du cytosquelette servent de réseau de séquestration pour les protéines Smad (Dong *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 2004). Par ailleurs, Dai *et al.* (2007) ont démontré que les protéines Smad2/3 se lient à la tubuline- β par leur domaine *MH2* et que ces protéines semblent entrer en compétition avec la Cx43 pour leur liaison au système tubuline/microtubules. Ceci suggère que la Cx43 pourrait réguler positivement la voie de signalisation du TGF- β en libérant les facteurs de transcription Smad2/3 séquestrés par les microtubules.

⁸ Les R-Smad renferment 5 sous-groupes qui se distinguent par le ligand qui les active: *Smad2* et *Smad3* (TGF- β /active) et *Smad1*, 5 et 8 (BMP) (Chen *et al.*, 1998).

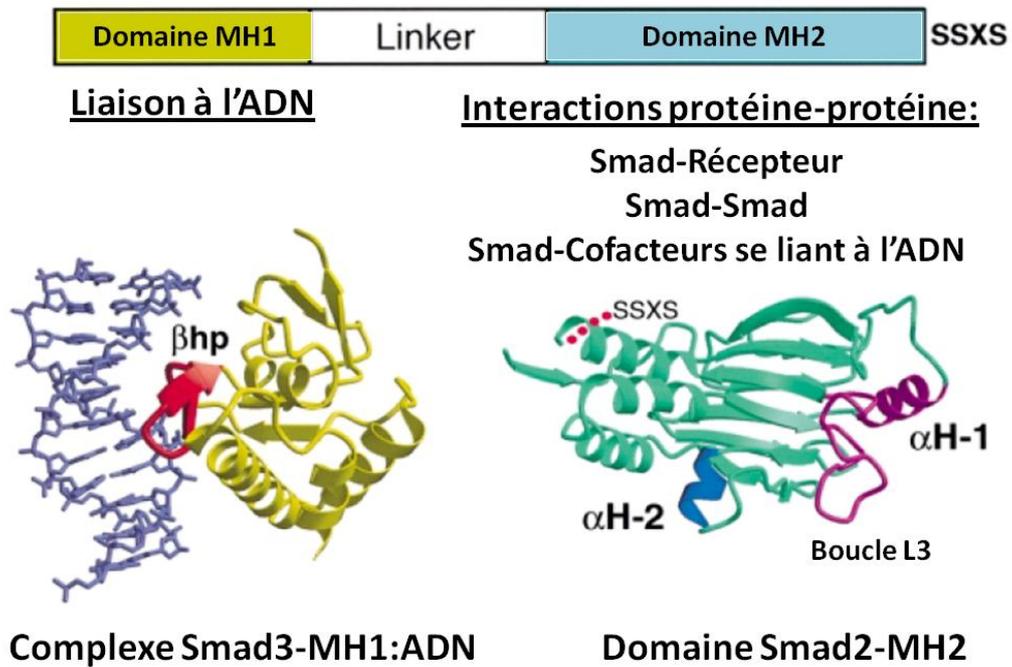


Figure 2.3 : Domaines structuraux de Smad et leurs fonctions

Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine *MH1* de *Smad3* lié à la séquence AGAC, et du domaine *MH2* de *Smad2*. Les principales interactions de ces deux domaines sont citées. Les structures impliquées dans ces interactions sont différenciées par un code couleur : la structure en épingle à cheveu (β -hairpin, βhp) qui permet la liaison à l'ADN, la boucle L3 et l'hélice $\alpha 1$ ($\alpha H-1$) qui spécifient l'interaction de Smad avec le récepteur de type I, et l'hélice $\alpha 2$ ($\alpha H-2$) qui spécifie l'interaction de Smad2 avec FAST. SSXS : site de phosphorylation par le récepteur (adapté de Shi *et al.*, 1997 ; Shi *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2000 ; Massagué et Wotton, 2000).

Chapitre III :
Analyse structurale des
protéines par RMN

1. Structure générale des protéines

1.1 Protéines : polymères d'acides aminés

Les protéines sont constituées de chaînes polypeptidiques où les monomères sont des résidus d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Le nombre de ces résidus permet de distinguer les *protéines*, nom commun donné aux polypeptides⁹, des *peptides* ou *oligopeptides* ayant un petit nombre de résidus. Chaque acide aminé possède une fonction amine ($-\text{NH}_2$), une fonction carboxyle ($-\text{COOH}$) et une chaîne latérale (symbolisée par la lettre R) portées par le même carbone. Des lettres grecques sont utilisées comme identifiants pour les atomes des acides aminés. Par convention, C^α est le carbone porteur des fonctions amine et carboxyle impliquées dans la liaison peptidique (présentée ci-après). Les carbones de la chaîne latérale sont notés dans l'ordre : C^β , C^γ , C^δ , C^ϵ . Il existe 20 acides aminés naturels (communs) dans les protéines. Ils sont de série L¹⁰ et se distinguent par la structure de leur chaîne latérale qui peut être aliphatique (linéaire, ramifiée ou cyclique) ou aromatique (**figure 3.1**) (Markley *et al.*, 1998).

⁹ La masse moléculaire moyenne des chaînes polypeptidiques dans les cellules eucaryotes est d'environ 31 700 Da (environ 270 résidus d'acides aminés), pour certaines protéines cette masse est beaucoup plus élevée (comme pour la titine qui est de 2 993 497 Da) (Garrett et Grisham, 2010).

¹⁰ La lettre « L » désigne la série de l'acide aminé selon la nomenclature de Fischer.

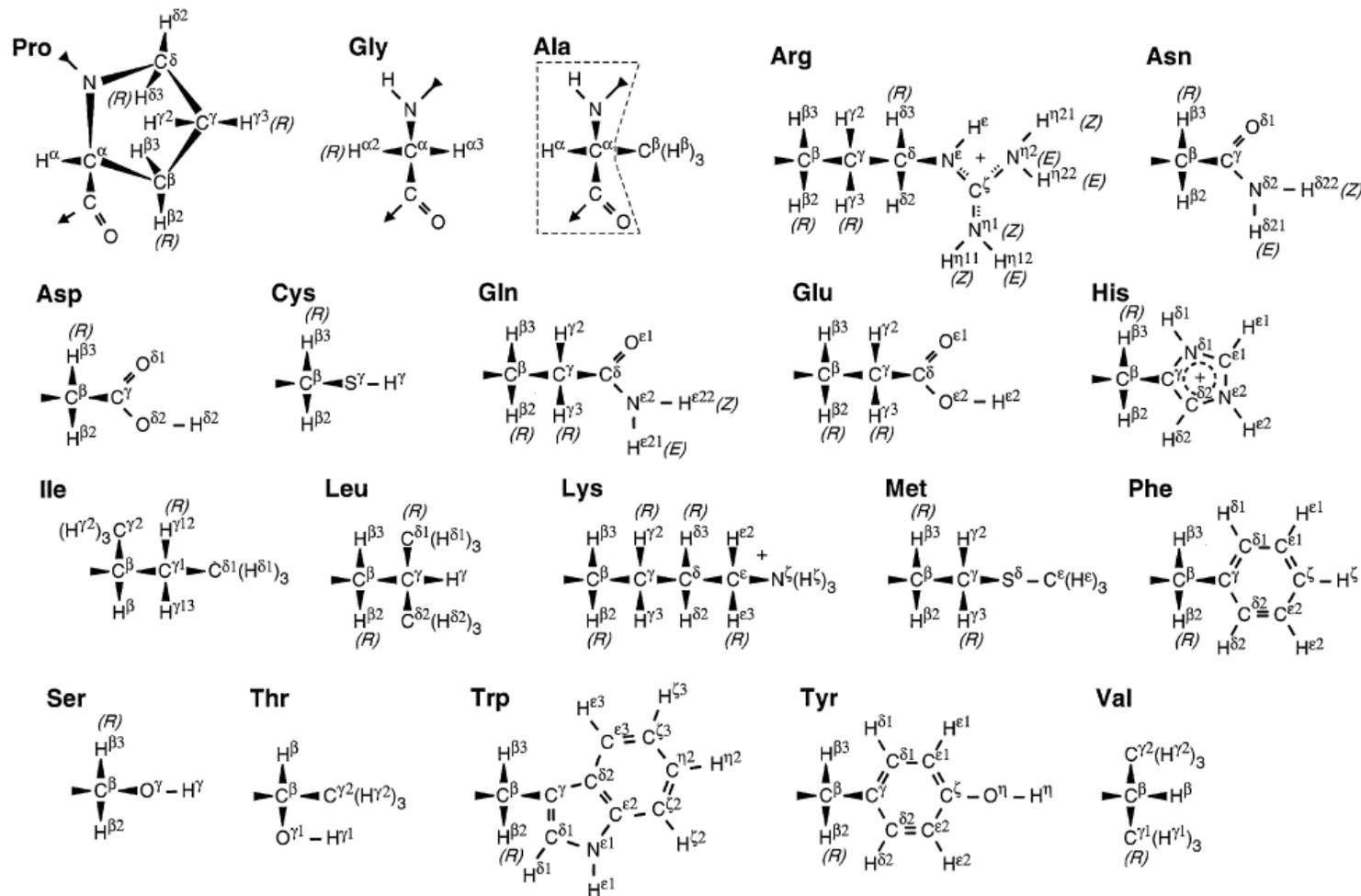


Figure 3.1 : Identifiants recommandés pour les atomes des vingt acides aminés¹¹ communs d'après les règles de la nomenclature IUPAC-IUB de 1969 (IUPAC-IUB, 1971 ; Markley et al., 1998)

¹¹ Le squelette est représenté pour les acides aminés Pro, Gly et Ala mais pas pour les autres L-acides aminés où seules sont représentées les chaînes latérales (R).

1.2 Liaison peptidique

Le squelette de la chaîne polypeptidique est formé par la succession d'éléments ($N-C^\alpha-C'$) reliés par des liaisons peptidiques¹². La liaison peptidique, qui est une liaison amide, est formée par une réaction de condensation du groupement carboxyle d'un acide aminé (i) et d'un groupement amine d'un acide aminé ($i+1$). Cette liaison possède un caractère de double liaison partielle à cause de la délocalisation de deux doublets d'électrons entre l'oxygène du carbonyle et l'azote de l'amide (phénomène de résonance). Ceci empêche la libre rotation autour de cette liaison, qui est considérée comme une liaison rigide et plane (Corey et Pauling, 1953 ; Marsh et Donohue 1967 ; Ramachandran *et al.*, 1974) (**figure 3.2**).

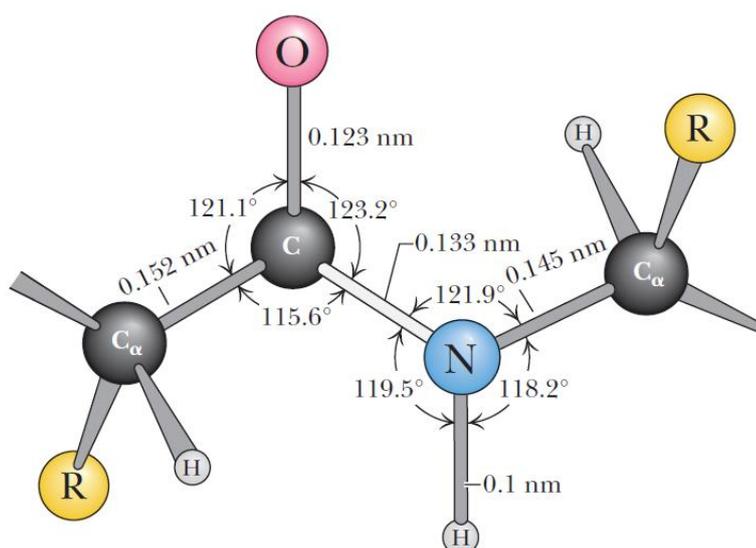


Figure 3.2 : Liaison peptidique représentée dans sa conformation usuelle « trans » de l'oxygène carbonyle et l'hydrogène amide

Les atomes $C\alpha$ sont les carbones α de deux acides aminés adjacents unis par une liaison peptidique. Les dimensions et angles sont les valeurs moyennes observées par analyse cristallographique des acides aminés et petits peptides. La liaison peptidique est la liaison de couleur claire entre C et N (Adapté de Ramachandran *et al.*, 1974) (Garrett et Grisham 2010)

Les atomes (C' , O, N et H) associés à la liaison amide (C'_i-N_{i+1}) sont coplanaires. Par conséquent, le squelette de la chaîne polypeptidique est constitué d'une alternance de plans rigides séparés par des groupements méthylène substitués $-HC^\alpha(R)-$. Ce squelette peut alors adopter une variété de conformations chacune déterminée par les valeurs des angles de rotation autour des liaisons $N-C^\alpha$ et $C^\alpha-C'$.

¹² Le carbone du carbonyle (CO) est désigné par C, C' ou CO selon l'utilisation et selon les références.

Par convention, les angles de rotation qui sont appelés *angles de torsion* ou *angles dièdres* (la liaison qui est concernée par la rotation est marquée par une flèche et les atomes du squelette sont aussi notés) sont marqués ϕ (*phi*) pour l'angle $C'_{i-1}-N_i-C'_i$ et ψ (*psi*) pour l'angle $N_i-C'_i-N_{i+1}$ (**figure 3.3**).

La liberté de rotation autour de ces liaisons est néanmoins limitée par l'encombrement stérique entre atomes de la chaîne principale et des chaînes latérales des résidus voisins.

Par ailleurs, l'angle de torsion autour de la liaison amide C'_i-N_{i+1} est appelé *angle ω (omega)* (**figure 3.3**). Il n'existe que deux configurations possibles pour cette liaison (amide) : une configuration *trans* qui est la plus stable pour des raisons stériques ($\omega=180^\circ$) et une configuration *cis* qui est moins stable à cause des interférences stériques ($\omega=0^\circ$) (Richardson, 1981).

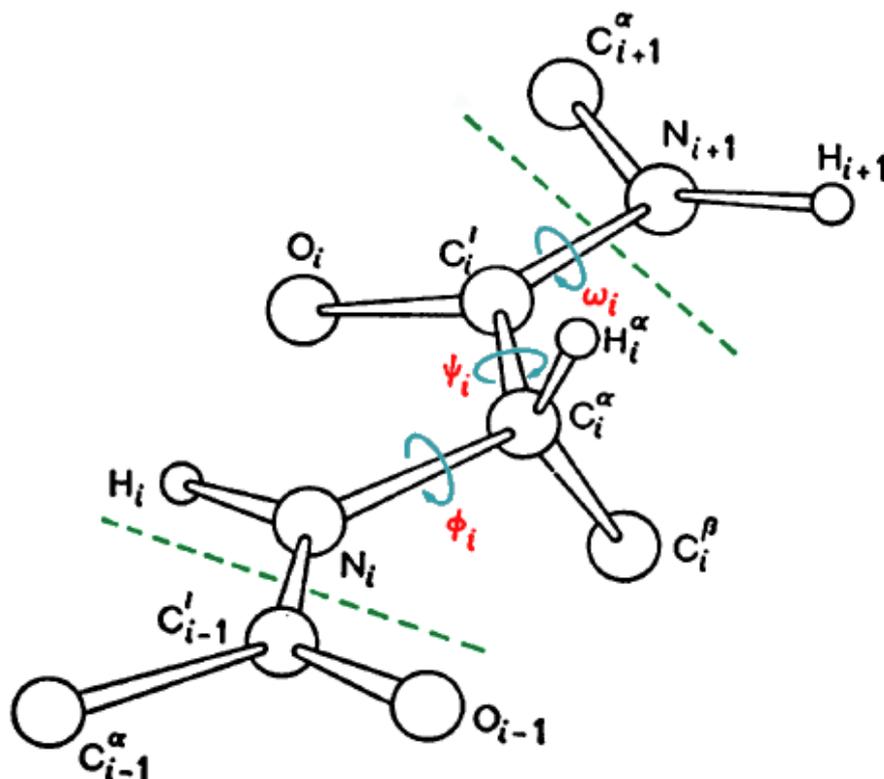


Figure 3.3 : Dessin en perspective d'une partie d'une chaîne polypeptidique représentant deux unités peptidiques

Les limites du résidu i sont indiquées en pointillés verts et les notations recommandées pour les atomes et les angles de torsion sont indiquées. La chaîne peptidique est montrée dans une conformation complètement étendue ($\phi_i=\psi_i=\omega_i=180^\circ$), et le résidu représenté est de série L (IUPAC-IUB, 1971).

Au sein de chaque résidu i , la conformation de la chaîne principale de la protéine est définie par les valeurs des angles dièdres ϕ et ψ .

1.3 Niveaux structuraux des protéines

Les protéines assurent des fonctions très diverses bien qu'elles soient composées des mêmes types de monomères. Ces fonctions sont étroitement associées à la structure des protéines qui est décrite à quatre niveaux d'organisation : *(i) la structure primaire* fait référence à la séquence (ordre) des acides aminés dans une chaîne peptidique; *(ii) la structure secondaire* définit le repliement local de la chaîne principal d'une protéine; *(iii) la structure tertiaire* décrit la conformation¹³ tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique incluant la position relative des éléments de structure secondaire; *(iv) la structure quaternaire* fait référence à la relation spatiale entre les chaînes polypeptidiques des protéines oligomériques.

Les protéines sont constituées soit d'un type prédominant de structure secondaire (protéines fibreuses) soit d'une combinaison variable d'éléments de structure secondaire (protéines globulaires). Les structures secondaires les plus fréquentes sont l'hélice α et le feuillet β , proposées pour la première fois par Pauling et Corey (Pauling *et al.*, 1951 ; Pauling et Corey, 1951b). Cependant, la présence de régions qui permettent des changements de directions de la chaîne peptidique est indispensable au compactage des protéines globulaires. Ces régions adoptent des structures irrégulières et non répétitives, conformation en pelote statistique (*random coil*) et *boucle*, et servent de motif de connexion pour les structures secondaires. Ces structures se trouvent généralement à la surface des protéines où elles participent à l'interaction avec d'autres protéines.

L'hélice α de pas « droit » est une des structures secondaires les plus stables et se rencontre aussi bien dans des protéines que dans des polypeptides synthétiques. Dans cette structure, le squelette polypeptidique s'étend en structure hélicoïdale avec un pas d'hélice de 0,54 nm (3,6 résidus par tour d'hélice). Chaque résidu allonge cette spirale d'environ 0,15 nm dans l'axe de l'hélice (incrément axial par résidu). Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre l'oxygène du carbonyle (C'O) de la liaison peptidique du résidu i et l'azote de l'amide (NH) du résidu $i+4$.

Il existe des variantes de l'hélice α . L'hélice 3_{10} , plus serrée, et l'hélice π , plus large, se présentent comme de courts segments aux extrémités des hélices α . L'hélice 3_{10} est moins commune que l'hélice α . Néanmoins, 3 à 4 % des résidus dans des structures cristallines se trouvent en hélice 3_{10} (Barlow et Thornton, 1988; Karpen *et al.*, 1992), ce qui permet de la placer comme la 4^e structure secondaire la plus commune après l'hélice α , le feuillet β et les coudes β (présentés ci-après). L'hélice 3_{10} est une hélice de pas « droit » où les liaisons

¹³ Une conformation désigne la disposition des atomes d'une protéine dans l'espace.

hydrogène s'établissent entre un résidu i et un résidu $i+3$ et permet donc un enroulement étroit de la chaîne. L'hélice 3_{10} est un peu moins stable que l'hélice α à cause de l'encombrement stérique, c'est pourquoi elle ne s'étend que sur un petit nombre de résidus, avec seulement 3 ou 4 résidus, comparé à la moyenne de 10 résidus pour l'hélice α (Barlow et Thornton, 1988).

Cependant, l'hélice π , également appelée *hélice* $4,4_{16}$, ne s'observe qu'occasionnellement dans les protéines dont elle se trouve aux extrémités des hélices α . L'hélice π implique 6 résidus et elle est stabilisée par une liaison hydrogène entre les résidus i et $i+5$. Les nombres 3 et 4,4 dans les appellations de l'hélice 3_{10} et de l'hélice $4,4_{16}$, respectivement, désignent le nombre de résidus par tour d'hélice. Les indices (10 et 16) désignent le nombre d'atomes dans l'anneau fermé par la liaison hydrogène. Ainsi, d'après cette convention, l'hélice α est une hélice $3,6_{13}$ (Rajashankar et Ramakumar, 1996 ; Ramachandran et Sasisekharan, 1968 ; Rohl et Doig, 1996) (**figure 3.4**).

La nature des chaînes latérales des acides aminés influence la conformation de la chaîne peptidique et peut ainsi favoriser la formation ou la rupture des hélices α (la méthionine, l'alanine, le glutamate et la leucine favorisent la formation alors que la proline et la glycine détruisent la régularité du squelette de l'hélice) (Richardson, 1981).

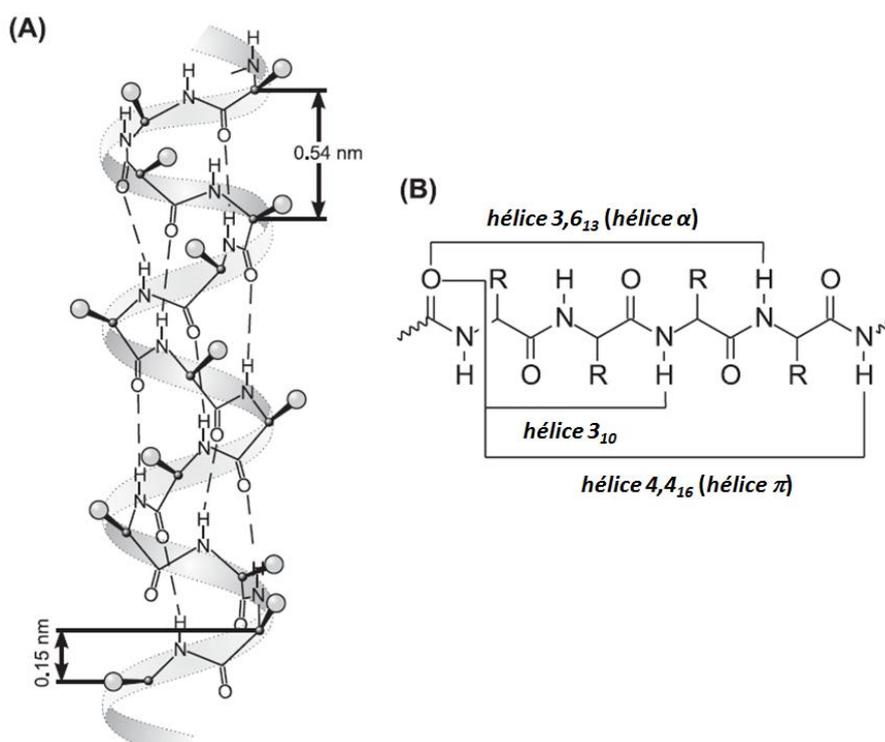


Figure 3.4 : Schéma des liaisons hydrogène de plusieurs hélices polypeptidiques

(A) Modèle de liaisons hydrogène dans des peptides de structure α -hélicoïdale

(B) Schéma de modèle des liaisons hydrogène pour différentes hélices (Sewald et Jakubke, 2002).

Le *feuillet* β est la deuxième structure secondaire la plus répandue. Dans cette structure, le squelette polypeptidique s'étend en zigzag et non en structure hélicoïdale. Ces chaînes polypeptidiques étirées (brins β) sont stabilisées par des liaisons hydrogène, qui s'établissent entre l'oxygène du carbonyle d'une liaison peptidique et l'azote de l'amide d'une autre liaison peptidique, entre des segments qui peuvent appartenir à la même chaîne ou à des chaînes différentes. L'orientation de l'enchaînement peptidique des deux brins adjacents peut être identique ou opposé et les feuillets sont dits respectivement *parallèles* ou *antiparallèles* (**figure 3.5**).

Les coudes sont des boucles formées d'un petit nombre de résidus. Ils se rencontrent lorsqu'une chaîne polypeptidique change brutalement de direction (180°). Le coude β est le type de coude le plus fréquent¹⁴. Il est constitué par un court segment peptidique (généralement 4 résidus) stabilisé par une liaison hydrogène qui se forme entre le carbonyle d'un premier résidu (i) et l'azote de l'amide d'un 4^e résidu ($i+3$) du coude. La glycine et la proline y apparaissent souvent. Il existe deux types majeurs de coudes β , qui se distinguent par leurs angles de torsion ϕ et ψ des 2^e et 3^e résidus : le type I ($\phi_2 = -60^\circ$, $\psi_2 = -30^\circ$, $\phi_3 = -90^\circ$, $\psi_3 = 0^\circ$) et le type II ($\phi_2 = -60^\circ$, $\psi_2 = +120^\circ$, $\phi_3 = +90^\circ$, $\psi_3 = 0^\circ$) (Horton *et al.*, 1994 ; Sewald et Jakubke, 2002 ; Voet et Voet, 2005) (**figure 3.6**).

¹⁴ Coude β : la lettre β rappelle qu'ils sont indispensables pour les feuillets β de chaînes *antiparallèles* et où ils sont souvent appelés *boucles en épingle à cheveux* (*β -hairpin*).

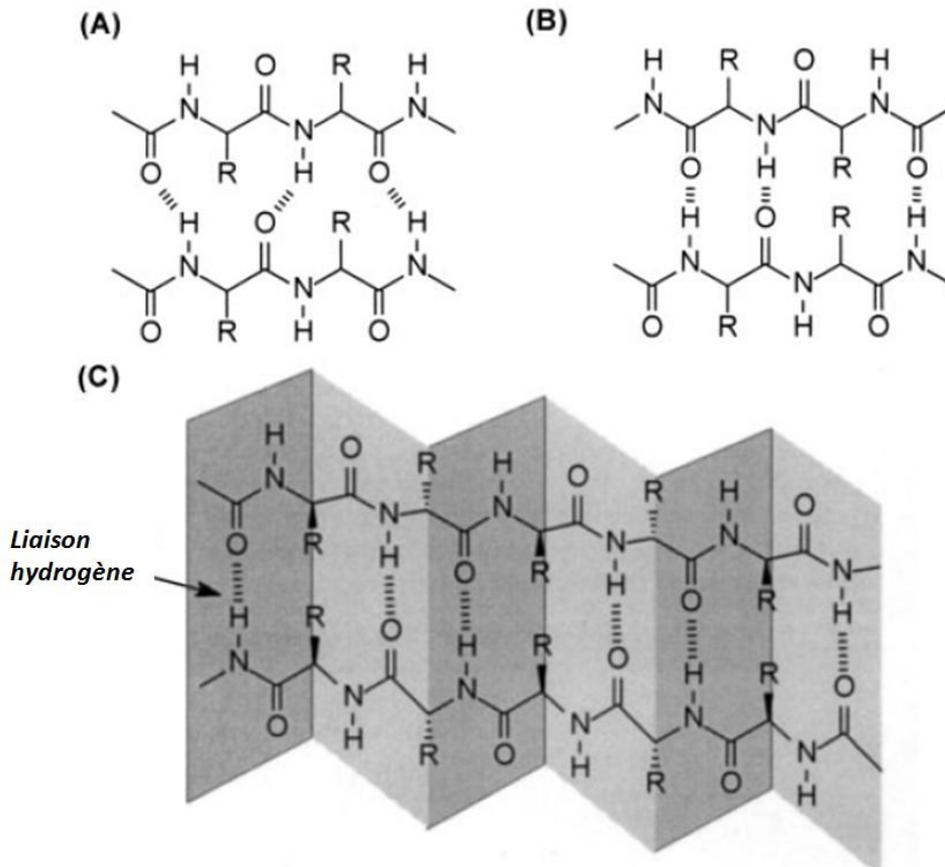


Figure 3.5 : Modèle de liaisons hydrogène dans des feuillets plissés β
 (A) feuillets parallèles (B, C) feuillets antiparallèles (Sewald et Jakubke, 2002).

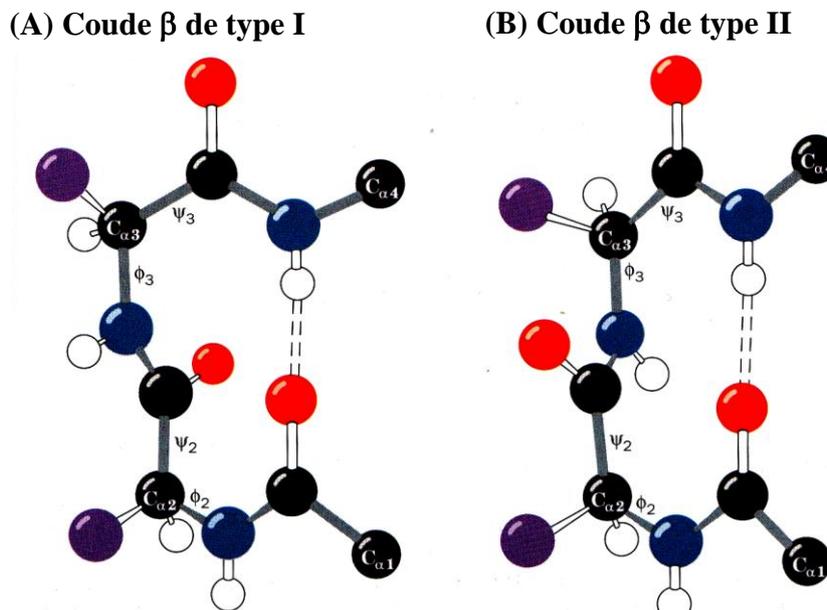


Figure 3.6 : Changement de direction dans les chaînes polypeptidiques
 (A) coude β de Type I (B) coude β de Type II (Voet et Voet, 2005).

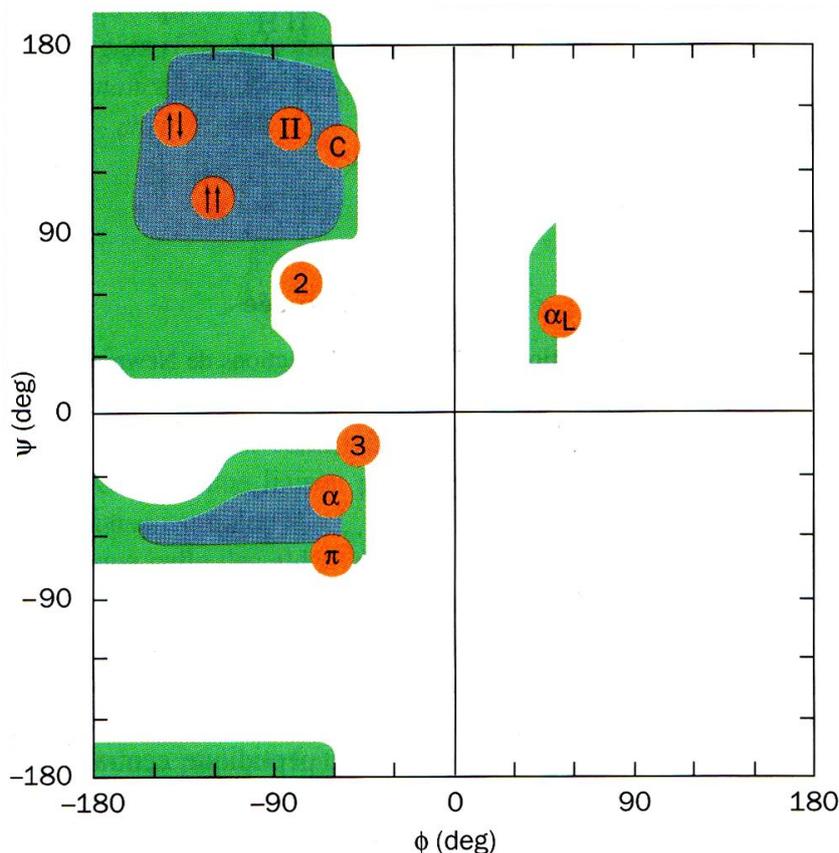
1.4 Diagramme de Ramachandran

Dans une protéine, la géométrie de la chaîne peptidique dépend donc des valeurs d'angles de torsion ϕ et ψ . Alors que théoriquement ces valeurs peuvent aller de -180° à $+180^\circ$, seules quelques valeurs sont autorisées à cause des encombrements stériques entre les atomes du squelette polypeptidique et ceux des chaînes latérales des acides aminés. En effet, une protéine ne peut adopter qu'un nombre restreint de conformations du squelette peptidique (hélice α , feuillet, coude β , etc.) caractérisées par des paires d'angles de torsion (ϕ et ψ) précis. L'hélice α présente des valeurs caractéristiques d'angles de torsion ($\phi = -57^\circ$ et $\psi = -47^\circ$) (**tableau 3.1**) mais ces valeurs peuvent subir des fluctuations en fonction de la nature des acides aminés. Ramachandran a étudié avec son équipe les différentes conformations possibles et impossibles pour de petits peptides de synthèse, résolues par cristallographie, et a calculé pour chaque conformation les valeurs d'angles de torsion (ϕ et ψ) qu'il a regroupées dans un diagramme qui porte son nom (*diagramme de Ramachandran*). Cette carte qui relie l'angle ψ (en ordonnée) à l'angle ϕ (en abscisse) est divisée en trois régions (favorable, permise, non permise ou interdite) (**figure 3.7**) (Ramachandran *et al.*, 1963 ; Ramachandran et Sasisekharan, 1968).

Tableau 3.1 : Angles de torsion approximatifs de quelques structures régulières

Structure secondaire	ϕ (deg)	ψ (deg)
Hélice α de pas à droite (α)	-57	-47
Feuillet plissé β parallèle ($\uparrow\uparrow$)	-119	+113
Feuillet plissé β antiparallèle ($\uparrow\downarrow$)	-139	+135
Hélice 3_{10} de pas à droite (3)	-49	-26
Hélice π de pas à droite (π)	-57	-70
Ruban $2,2_7$ (2)	-78	+59
Hélice de polyglycine de pas à gauche II et de poly-L-proline (II) (II)	-79	+150
Collagène (C)	-51	+153
Hélice α de pas à gauche (α_L)	+57	+47

(Adapté de Flory, 1969 ; IUPAC-IUB, 1971) (Voet et Voet, 2005).

**Figure 3.7** : Diagramme de Ramachandran

Valeurs des angles ϕ et ψ stériquement permises pour la poly-L-Alanine. Les régions où les angles ϕ et ψ sont « normalement autorisés » sont ombrées en bleu, tandis que les régions ombrées en vert correspondent à des conformations qui ont des distances de van der Waals « limites ».

Les structures secondaires sont indiquées sur le graphe selon la nomenclature apparaissant dans le **tableau 3.1** (Adapté de Ramachandran et Sasisekharan, 1968) (Voet et Voet, 2005).

2. Analyse structurale des peptides/protéines par RMN

Les protéines constituent des polymères biologiques qui peuvent adopter chacun un ensemble de conformations dans l'espace. Cependant, pour la majorité des protéines une seule conformation, dite *native*, correspond à un état fonctionnel (qui s'oppose à l'état *dénaturé*) (Solomatin *et al.*, 2000). Le repliement tridimensionnel des protéines codé par leur séquence en acides aminés (structure primaire) est déterminant pour la fonction de ces molécules (Anfinsen, 1968). Cela souligne l'intérêt majeur et l'enjeu que représente la résolution de ces structures (Thornton *et al.*, 2000). Actuellement, les structures tridimensionnelles des protéines sont déterminées à une résolution atomique par deux types de techniques : (i) la *radiocristallographie par rayons X* qui permet la détermination de la structure de protéines cristallisées en utilisant la diffraction des rayons X au travers des cristaux, (ii) la *spectroscopie¹⁵ par résonance magnétique nucléaire (RMN)* qui permet d'étudier la structure de molécules en solution dont les protéines.

La RMN présente quelques avantages sur la radiocristallographie, comme en général la possibilité de conserver l'état natif de la protéine, l'étude en solution des interactions moléculaires ligand/protéine, l'étude de la dynamique conformationnelle (repliement des protéines, cinétique enzymatique, etc.) et l'étude de l'influence du solvant (force ionique, pH, encombrement stérique, ...). Ces techniques sont toutes deux puissantes et performantes et sont complémentaires puisqu'elles présentent jusqu'à présent certains facteurs limitants comme l'obtention de monocristaux qui diffractent pour la radiocristallographie et du côté RMN en solution des limitations liées à la masse des protéines, à la nécessité en règle d'avoir des protéines solubles et qui ne forment pas des multimères.

2.1 Principe de la spectroscopie par RMN

La *résonance magnétique nucléaire* est une technique spectroscopique qui exploite une propriété fondamentale de la matière qui est le *spin¹⁶* du noyau d'un atome ou spin *nucléaire*. Le nombre quantique de *spin* noté *I* est un multiple de 1/2 (1/2, 1, 3/2, 2, 5/2...). Ce nombre dépend du nombre de protons et de neutrons dans le noyau. Seuls les noyaux d'atomes possédant soit les protons soit les neutrons en nombre impair peuvent être détectés par RMN, ce qui permet d'avoir un nombre de spin (*I*) égal à 1/2 (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ¹⁹F...). Par contre, les atomes avec un nombre pair de neutrons et de protons possèdent un nombre de *spin* nul

¹⁵ La spectroscopie est un terme général désignant la science qui étudie les interactions de différents types de radiations avec la matière. Les méthodes spectrométriques les plus courantes utilisent des radiations électromagnétiques (Skoog *et al.*, 2007).

¹⁶ Le spin est une propriété quantique de rotation des particules (électrons, protons et neutrons).

($I = 0$) et ne peuvent donc être observés par RMN (^{16}O , ^{12}C ...). Dans l'étude des protéines, l'isotope « naturel » d'hydrogène (le protium : ^1H) est l'observable privilégié de la RMN de par son abondance dans la nature ($\approx 100\%$) (**tableau 3.2**). La RMN de l'atome d'hydrogène ^1H , qui n'est constitué que d'un proton, est aussi appelée RMP pour *Résonance Magnétique du Proton*.

Le *spin nucléaire* qui représente une propriété quantique de rotation des particules (protons et neutrons) peut être visualisé, en mécanique classique, comme la rotation de ces particules sur elles-mêmes. Cette rotation crée un dipôle magnétique qui est caractérisé par son moment magnétique¹⁷. Bien que les neutrons soient des particules neutres, ils possèdent un moment magnétique de même que les protons. Ceci permet d'assimiler ces particules à des micro-aimants. Les noyaux placés dans un champ magnétique puissant noté B_0 s'alignent avec le champ magnétique externe et ont différents états de spin. Le nombre d'orientations que le noyau adoptera dans un champ magnétique est déterminé par la relation $(2I+1)$. L'atome d'hydrogène ^1H , dont le nombre de spin (I) est égal à $1/2$, a deux orientations : *un état de basse énergie* noté $(+1/2)$ ou α , où l'alignement est parallèle à B_0 , et *un état de haute énergie* noté $(-1/2)$ ou β , où l'alignement est antiparallèle à B_0 .

En RMN, l'irradiation de ces noyaux par des ondes électromagnétiques du domaine des radiofréquences permet la transition de l'état α à l'état β . L'absorption de l'énergie des photons durant cette transition est aussi appelée *résonance* et constitue la base de cette technique. Cependant, la résonance n'est possible que si l'énergie des radiations électromagnétiques appliquées ($E = h\nu$) correspond exactement à celle de la différence d'énergie entre les deux états de spin ($\Delta E = h\gamma B_0/2\pi$; où γ est le rapport gyromagnétique propre à chaque noyau) (**tableau 3.2**).

¹⁷ Le moment magnétique est une grandeur vectorielle qui permet de mesurer l'intensité d'une source magnétique.

Tableau 3.2 : Propriétés nucléaires de quelques isotopes qui possèdent un spin

Noyau	Nombre de proton non apparié	Nombre de neutron non apparié	Nombre de spin	Abondance naturelle %	$\gamma/2\pi$ (MHz/T)
^1H	1	0	1/2	≈ 100	42,58
^2H	1	1	1	0,01	6,54
^{13}C	0	1	1/2	1	10,71
^{14}N	1	1	1	≈ 100	03,08
^{15}N	1	0	1/2	0,4	-04,32
^{31}P	1	0	1/2	100	17,25

Ainsi, la fréquence appliquée est appelée fréquence de résonance ou fréquence de Larmor ($\nu = \gamma B/2\pi$), elle est donnée en MHz (10^6 Hz). Les spectromètres les plus souvent utilisés opèrent à des fréquences de Larmor du proton de 500 à 800 MHz. Ces fréquences sont proportionnelles à B_o .

Bien que tous les protons possèdent le même moment magnétique, ils résonnent à des valeurs de fréquence différentes. En effet, chaque proton résonne à une fréquence qui lui est propre car il est soumis à un champ B_{effectif} plus faible que B_o [$B_{\text{effectif}} = B_o (1 - \sigma)$] (σ : constante d'écran). Le proton est dit *blindé* ou *protégé* par l'écran généré par le nuage électronique qui s'oppose au champ externe B_o et caractérise l'environnement du noyau étudié. Il y a autant de fréquences absorbées effectives notées ν_e ($h\nu_e$) qu'il y a de noyaux de spin 1/2 d'environnement différents.

La résonance de chaque proton (noyau de l'atome d'hydrogène) est ainsi fortement affectée par son environnement. Elle dépend de l'électronégativité de l'atome qui est lié à l'hydrogène comme l'atome de carbone, d'azote et d'oxygène. Quand l'électronégativité de ce dernier est élevée le nuage électronique de l'atome d'hydrogène est attiré vers l'atome en question et l'hydrogène est dit *déblindé*. Cette résonance est aussi influencée par la proximité de noyaux aromatiques (Trp, Tyr, Phe) et du milieu dans lequel la molécule se trouve (**figure 3.8**).

Les différents environnements chimiques des protons vont permettre ainsi d'avoir une gamme de valeurs de fréquence appelée *déplacement chimique* de ces noyaux. Le déplacement chimique, noté δ , est un rapport de fréquence.

$$\delta \text{ (ppm)} = [(\nu_e - \nu_r)/\nu_r] \times 10^6 \quad (\nu_r : \text{fréquence du produit de référence utilisé}).$$

Comme la différence entre ν_e et ν_r est de l'ordre de quelques Hz et que ν_o est de l'ordre du MHz, le déplacement chimique (δ) est désigné en *parties par million* ou *ppm* (Keeler, 2002).

Les produits de référence les plus utilisés pour les noyaux (^1H et ^{13}C) sont des composés qui contiennent l'élément *silicium* : le TMS (tetraméthylsilane), le DSS (2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate) et le DSA (4,4-diméthyl-4-silapentane-1-ammonium trifluoroacetate). Puisque le carbone est plus électronégatif que le silicium (2,5 *versus* 1,9), les spins des protons et carbones de ces composés sont fortement blindés. Ces composés résonnent ainsi à une fréquence plus faible que celle des autres molécules et servent de référence pour les spectres RMN (**figure 3.8**).

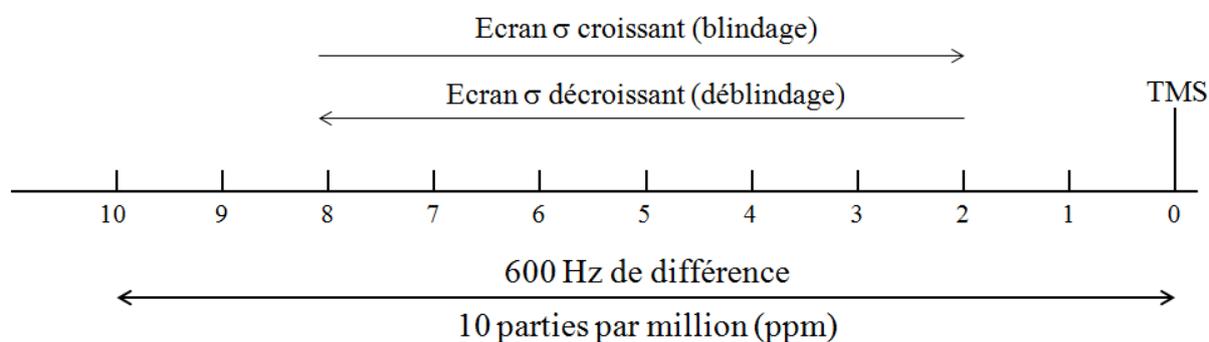


Figure 3.8 : Relation entre la constante d'écran et le déplacement chimique

Pour un spectromètre à 60 MHz, un déplacement chimique (δ) de 10 ppm correspond à une différence de 600 Hz par rapport à la référence (0 ppm).

2.2 Détermination de la structure tridimensionnelle des peptides/protéines par RMN

La détermination de structure des peptides/protéines est un processus assez complexe faisant intervenir des compétences dans des domaines variés comme *la biologie moléculaire et la biochimie* (surexpression et purification des protéines), *la biophysique* (étude structurale par spectroscopie RMN) et *la bioinformatique* (calcul de structure par modélisation moléculaire).

Depuis la première structure tridimensionnelle de protéine en solution résolue par la RMN du proton à deux dimensions (2D) en 1985 par l'équipe de Kurt Wüthrich (Williamson *et al.*, 1985) des progrès technologiques et méthodologiques ont été réalisés, visant particulièrement à améliorer la résolution et la sensibilité de la technique.

Le matériel RMN a connu un essor technologique remarquable par la conception de spectromètres performants pouvant générer des champs magnétiques intenses (1000 MHz) et

par l'élaboration d'équipements spécifiques (cryosondes et nanosondes). De plus, le succès de la RMN ne tient pas qu'aux progrès technologiques mais également aux avancées méthodologiques comme le développement de nouvelles stratégies de marquage isotopique (^{15}N , ^{13}C , ^2H) des protéines (Gardner et Kay, 1997 ; Gardner et Kay, 1998), de séquences RMN 3D et 4D (Clore et Gronenborn, 1991 ; Grzesiek et al., 1993).

L'application de l'ensemble de ces progrès a fait de la RMN un outil très puissant pour l'étude de la structure des protéines et a permis de repousser ses limites, comme la masse moléculaire limite pour les protéines (Fiaux *et al.*, 2002). Aujourd'hui on peut trouver dans la littérature des rapports d'attribution de protéines de plus de 100 kDa comme la 7,8-dihydroneopterin Aldolase de 110 kDa (Salzmann *et al.*, 2000) ainsi que des structures tridimensionnelles de protéines proches de 100 kDa comme la malate synthase G de 82 kDa (Tugarinov *et al.*, 2005).

La détermination de la structure secondaire et tertiaire d'une protéine ou d'un peptide par RMN suit un protocole standard qui inclut plusieurs étapes : préparation d'échantillons, acquisition des spectres, traitement de signal, attribution des déplacements chimiques et génération des contraintes structurales qui sont utilisées pour la modélisation moléculaire (**figure 3.9**). Il faut noter néanmoins que les moyens employés au cours de ces étapes restent étroitement dépendants de la masse moléculaire de la protéine étudiée (Foster *et al.*, 2007).

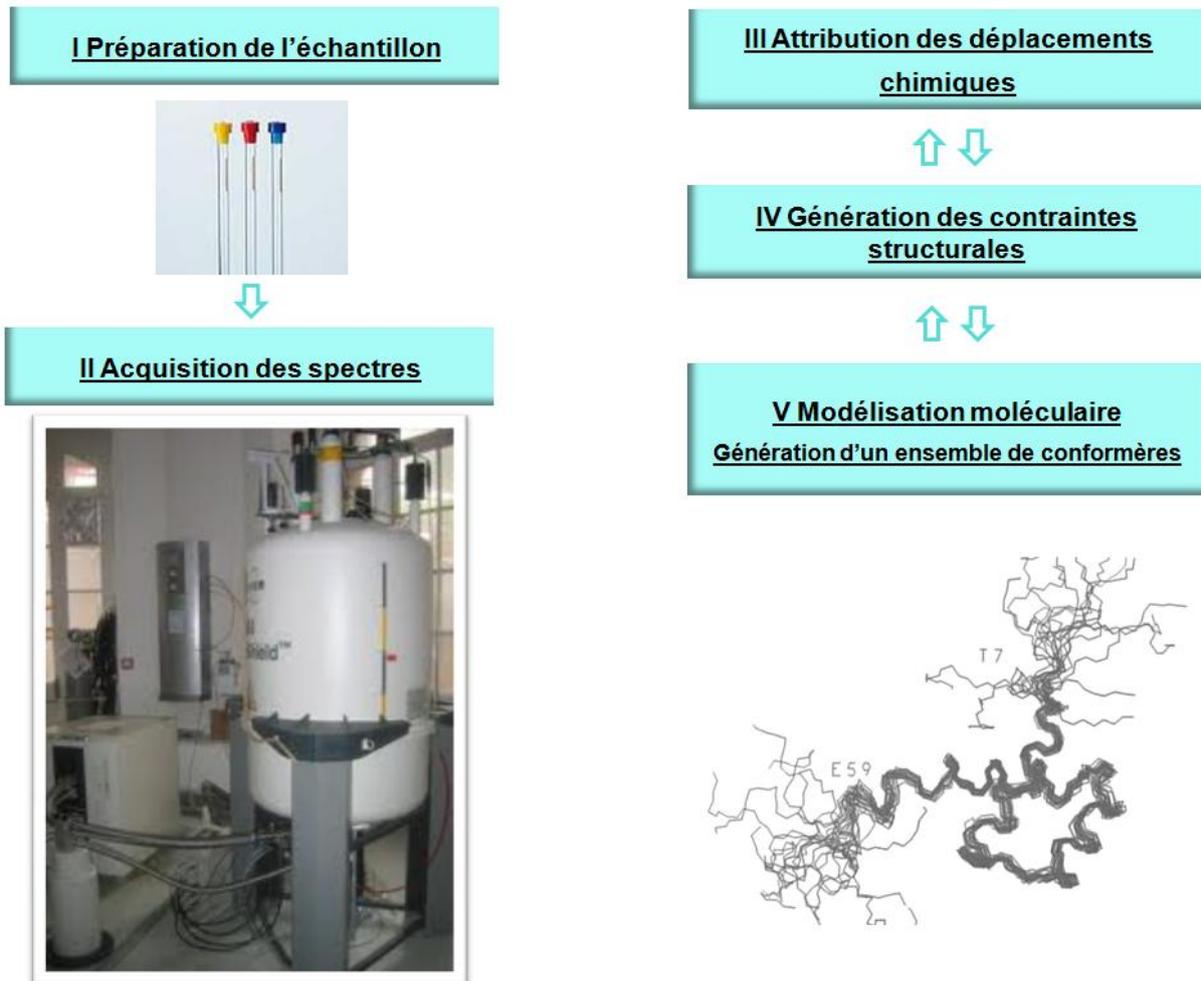


Figure 3.9 : Protocole standard de la détermination de la structure tridimensionnelle des protéines par RMN

Les conformères représentés ici sont ceux d'un homéodomaine¹⁸ d'antennapedia de la drosophile (Wüthrich, 2003).

¹⁸ Un homéodomaine : un domaine de liaison à l'ADN retrouvé dans les facteurs de transcription

Préparation de l'échantillon

Cette étape est très variable en fonction de la nature de l'échantillon. Elle peut durer plusieurs mois pour les protéines qu'il faut produire et purifier ou quelques heures pour les peptides synthétiques qu'il suffit de solubiliser dans un solvant approprié. Afin d'augmenter la sensibilité des techniques RMN, on concentre les échantillons (peptides/protéines) autant que possible (concentrations de l'ordre du millimolaire). Néanmoins, le développement de cryosondes a permis de réduire les concentrations requises pour l'étude des peptides/protéines par RMN tout en améliorant la sensibilité des spectromètres.

En plus de la concentration des échantillons, les autres conditions expérimentales comme la nature du tampon, la force ionique, le pH de la solution et la température doivent être minutieusement choisies et testées afin d'optimiser la qualité des spectres RMN et d'éviter la dénaturation des peptides/protéines et leur agrégation. Ainsi, pour la température d'acquisition qui peut varier dans une large gamme, ces échantillons doivent rester stables pendant la durée de l'acquisition des spectres. Les échantillons sont généralement solubilisés dans des tampons appropriés avec des pH acides à neutres.

Acquisition des spectres et traitement de signal

La caractérisation structurale des peptides/protéines par RMN en solution est généralement réalisée en solution aqueuse. Cependant, l'eau protonée donne un signal très important en RMN qu'il est nécessaire de supprimer efficacement. Ainsi, avant ou au cours de chaque acquisition, une suppression du signal de l'eau est réalisée par l'utilisation d'une séquence appropriée telle que la séquence ES (Hwang, Chaka, 1995) ou la séquence WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992). Les protons amide du squelette peptidique sont labiles et sont susceptibles de s'échanger avec le deutérium de l'eau lourde, ce qui limite son utilisation.

Les expériences utilisées dans l'étude des peptides/protéines par RMN varient en fonction de l'objectif recherché. Elles restent très dépendantes de la taille des protéines étudiées.

L'abondance des protéines/peptides en protons incite à l'utilisation de la RMN du proton pour l'étude structurale des molécules de masse moléculaire inférieure à 10 kDa. La RMN à une seule dimension (1D) est très utilisée puisqu'elle permet d'avoir rapidement un aperçu sur la structuration et/ou la stabilité des peptides/protéines. Par ailleurs, la RMN à deux dimensions (2D) est aussi largement utilisée pour l'analyse structurale de ces molécules. Deux expériences homonucléaires (^1H - ^1H) bidimensionnelles sont particulièrement employées : la TOCSY (Total CORrelated SpectroscopY) (Braunschweiler et Ernst, 1983) et la NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) (Kumar *et al.*, 1980). Ces deux

expériences sont largement utilisées car elles ne nécessitent pas de marquage isotopique et le seul noyau observé est le proton. Les spectres TOCSY et NOESY sont appelés *spectres de corrélation des déplacements chimiques* parce qu'ils permettent d'observer des paires de noyaux couplés. La corrélation (couplage) de deux protons correspond à un transfert d'aimantation d'un proton à un autre. Il existe deux types de couplage en fonction de la technique utilisée. Le *couplage scalaire* observé au cours de l'expérience TOCSY correspond à un transfert d'aimantation à travers un petit nombre de liaisons covalentes (généralement 2 ou 3 liaisons covalentes). La TOCSY fournit donc des informations sur la connectivité des atomes d'une molécule, c'est-à-dire sur sa formule développée plane. Le *couplage dipolaire*, nommé aussi *effet nucléaire Overhauser (NOE)*, est plutôt observé au cours de l'expérience NOESY où l'aimantation est transférée à travers l'espace. Ce transfert d'aimantation est proportionnel à $1/r^6$ où r est la distance séparant les deux noyaux couplés. L'effet *NOE* ne peut être observé qu'entre deux protons proches dans l'espace quand la distance (r) est généralement inférieure ou égale à 5 Å.

Différentes régions sont définies pour les spectres TOCSY et NOESY en fonction de la nature des protons impliqués dans la corrélation. Ces derniers correspondent aux protons amides (H_N), aux protons aromatiques, aux protons α (H_α) et aux autres protons aliphatiques (H_β , H_γ , etc.). En fonction de la nature du proton impliqué dans le couplage dipolaire, six régions notées de **a** à **f** sont définies dans la **figure 3.10**. Ces protons ainsi couplés peuvent appartenir au même acide aminé (corrélation intra-résidu) ou à des acides aminés voisins dans la chaîne peptidique ou dans l'espace (corrélation inter-résidus). Il faut noter que la région présentant les couplages dipolaires entre les protons amides H_N-H_N (notée **a** dans la **figure 3.10**) est spécifique au spectre NOESY (Wüthrich, 1986).

En plus des spectres homonucléaires 2D où la corrélation a lieu uniquement entre les protons ($^1H-^1H$), il existe également des spectres hétéronucléaires 2D où la corrélation a lieu entre le proton et un autre isotope comme le ^{13}C ou le ^{15}N ($^1H-^{13}C$, $^1H-^{15}N$). L'utilisation de noyaux (^{15}N , ^{13}C) qui résonnent dans des gammes de fréquences différentes de celle des protons a permis de résoudre certains problèmes (superpositions de pics, élargissement des raies) rencontrés souvent dans l'étude des protéines de masse moléculaire élevée.

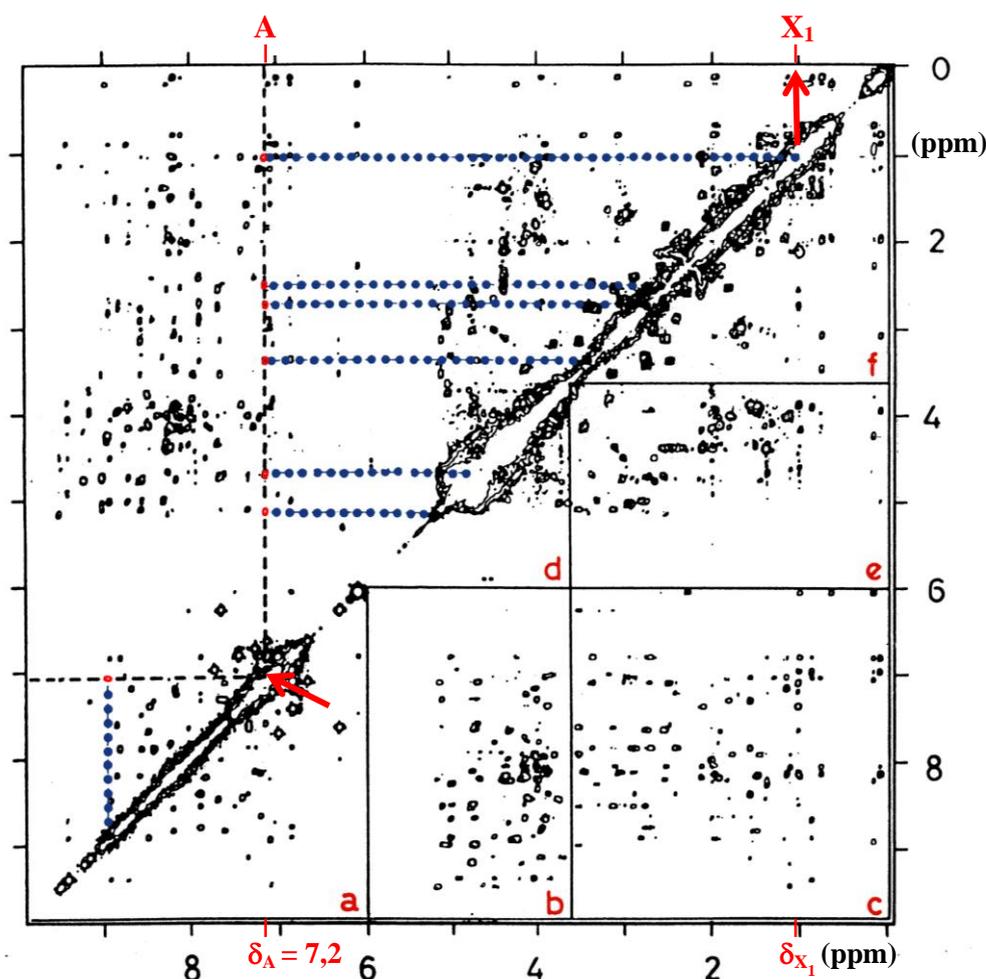


Figure 3.10 : Spectre homonucléaire 2D (^1H - ^1H) NOESY d'un inhibiteur de protéinase IIA (BUSI II A)¹⁹ (0,016 M ; pH 4,9 ; 45 °C ; 500 MHz) (Adapté de Wider *et al.*, 1984) (modifié d'après Wüthrich, 1986).

Cette protéine possède une masse moléculaire de 6500 Da.

Au dessus de la diagonale, les lignes discontinues passant par le pic d'un proton A de la diagonale (de déplacement chimique $\delta_A = 7,2$ ppm) permettent de repérer (en rouge) les différents pics de corrélation dipolaires ou pics *NOE* qui sont couplés avec le proton A.

Les lignes en pointillés bleus indiquent comment les pics de la diagonale pour chaque proton couplé avec le proton A sont identifiés.

Au dessous de la diagonale, six régions de corrélation dipolaire notées de **a** à **f** sont indiquées. Elles délimitent les zones correspondant aux pics de corrélation entre les protons :

- a** : H_N ; aromatiques – H_N ; aromatiques.
- b** : H_N ; aromatiques – H_α ; H_δ de Pro ; H_β de Ser et Thr.
- c** : H_N ; aromatiques – chaînes latérales aliphatiques.
- d** : H_α ; H_δ de Pro ; H_β de Ser et Thr – H_α ; H_δ de Pro ; H_β de Ser et Thr.
- e** : H_α ; H_δ de Pro ; H_β de Ser et Thr – chaînes latérales aliphatiques.
- f** : Chaînes latérales aliphatiques – chaînes latérales aliphatiques.

¹⁹ BUSI II A: Proteinase inhibitor II A from bull seminal plasma

Attribution des spectres

L'attribution des déplacements chimiques observés à des atomes individuels constitue une étape fondamentale dans la détermination de la structure tridimensionnelle d'un peptide ou d'une protéine (Wüthrich *et al.*, 1982). Les spectres enregistrés lors de l'acquisition sont par la suite traités à l'aide de logiciels comme NMRPIPE (Delaglio *et al.*, 1995), TOPSPIN (Bruker) ou d'autres afin d'effectuer une transformée de Fourier. Ensuite, les spectres RMN sont visualisés et analysés avec d'autres programmes (on peut notamment citer NMRVIEW (Johnson et Blevins, 1994), XEASY (Bartels *et al.*, 1995), SPARKY (Kneller et Goddard, 1997), etc.).

L'exploration des spectres TOCSY et NOESY homonucléaires se révèle suffisante pour l'étude des protéines de faible masse moléculaire. Ces spectres se caractérisent par différentes régions qui se distinguent par la nature des protons qui y sont impliqués comme ceci a déjà été décrit pour le spectre NOESY (cf. **figure 3.10**). Ainsi, dans la région qui présente les corrélations protons amides-protons aliphatiques, un système de spin²⁰ correspond à tous les couplages scalaires entre le proton amide de chaque résidu d'acide aminé et ses protons aliphatiques (H_{α} , H_{β} , etc.).

La première étape de l'attribution est de repérer tous les systèmes de spin d'un peptide ou d'une protéine. Il y a généralement autant de systèmes de spin qu'il y a d'acides aminés dans une protéine, même s'il y a un certain nombre d'exceptions (par exemple la proline qui est en fait un acide iminé et par conséquent ne possède pas de proton H_N et le résidu N-terminal où le H_N est labile).

Dans un deuxième temps, il faut attribuer à chaque système de spin ainsi repéré un acide aminé. L'attribution des systèmes de spin est une étape qui peut être assez longue surtout quand le nombre d'acides aminés est important. Pour réaliser cette attribution, on fait appel généralement à la procédure mise en place par K. Wüthrich (1986) (**tableau 3.3**). Ce tableau présente les déplacements chimiques observés pour les protons des 20 acides aminés en position non terminale (X) dans des térapeptides non structurés GGXA. Il est recommandé de commencer l'attribution par la recherche des déplacements chimiques particuliers comme ceux des protons aromatiques et des protons aliphatiques caractéristiques de certains résidus d'acides aminés comme les protons δCH_3 du résidu isoleucine qui présentent un déplacement chimique de 0,89 ppm et les protons γCH_3 du résidu thréonine qui présentent un déplacement chimique de 1,23 ppm. La recherche des systèmes de spin des résidus glycine pourrait

²⁰ Un système de spin est un groupe d'atomes couplés de façon scalaire.

également être intéressante puisque ce résidu ne possède qu'un seul type de couplage scalaire H_N-H_α (le carbone α porte deux protons α équivalents et pas de carbone β) (Wüthrich, 1986).

Tableau 3.3 : Déplacements chimiques des protons ^1H pour les résidus^a des 20 acides aminés communs en *random coil* (Wüthrich, 1986)

Résidus	NH	αH	βH	Autres
Gly	8,39	3,97		
Ala	8,44	4,35	1,39	
Val	8,44	4,18	2,13	γCH_3 0,97 ; 0,94
ILe	8,19	4,23	1,90	γCH_2 1,48 ; 1,19 γCH_3 0,95 δCH_3 0,89
Leu	8,42	4,38	1,65 ; 1,65	γH 1,64 δCH_3 0,94 ; 0,90
Pro ^b		4,44	2,28 ; 2,02	γCH_2 2,03 ; 2,03 δCH_2 3,68 ; 3,65
Ser	8,38	4,50	3,88 ; 3,88	
Thr	8,24	4,35	4,22	γCH_3 1,23
Asp	8,41	4,76	2,84 ; 2,75	
Glu	8,37	4,29	2,09 ; 1,97	γCH_2 2,31 ; 2,28
Lys	8,41	4,36	1,85 ; 1,76	γCH_2 1,45 ; 1,45 δCH_2 1,70 ; 1,70 ϵCH_2 3,02 ; 3,02 ϵNH_3^+ 7,52
Arg	8,27	4,38	1,89 ; 1,79	γCH_2 1,70 ; 1,70 δCH_2 3,32 ; 3,32 NH 7,17 ; 6,62
Asn	8,75	4,75	2,83 ; 2,75	γNH_2 7,59 ; 6,91
Gln	8,41	4,37	2,13 ; 2,01	γCH_2 2,38 ; 2,38 δNH_2 6,87 ; 7,59
Met	8,42	4,52	2,15 ; 2,01	γCH_2 2,64 ; 2,64 ϵCH_3 2,13
Cys	8,31	4,69	3,28 ; 2,96	
Trp	8,09	4,70	3,32 ; 3,19	2H 7,24 4H 7,65 5H 7,17 6H 7,24 7H 7,50 NH 10,22
Phe	8,23	4,66	3,22 ; 2,99	2,6H 7,30 3,5H 7,39 4H 7,34
Tyr	8,18	4,66	3,13 ; 2,92	2,6H 7,15 3,5H 6,86
His	8,41	4,63	3,26 ; 3,20	2H 8,12 4H 7,14

^a Données pour les résidus X en position non terminale dans les térapeptides GGXA, pH 7,0, 35 °C [Adapté de Bundi et Wüthrich (1979), excepté que des données plus précises ont été obtenues pour la Leu, Pro, Lys, Arg, Met et Phe en utilisant de nouvelles mesures à 500 MHz]

^b Données pour la Pro en *trans*.

Dans un troisième temps, nous devons réaliser une attribution séquentielle qui permet d'obtenir des informations sur l'ordre des systèmes de spin, c'est-à-dire la position de chaque système de spin au sein de la séquence primaire de la protéine. Pour cela, il faut combiner les informations obtenues lors de l'attribution des systèmes de spin à la séquence primaire de la protéine. L'exploitation du spectre TOCSY se révèle insuffisante pour réaliser une attribution séquentielle qui nécessite des informations sur les interactions inter-résidus. Ces informations sont fournies par l'exploitation des spectres NOESY qui contiennent des pics de corrélation dipolaire (*NOE*) entre protons proches dans l'espace. Pour faire correspondre à chaque acide aminé son système de spin approprié, nous utilisons certaines corrélations qui permettent de retrouver l'enchaînement de deux résidus d'acide aminé ($i, i+1$) puisque le proton amide (H_N) du résidu $i+1$ donne des pics de corrélation avec les protons aliphatiques (H_α, H_β) du résidu précédent (i), ces pics de corrélation inter-résidus sont appelés *NOE séquentiels*. La recherche de ces pics, qui constitue la base de l'attribution séquentielle, permet de résoudre le problème d'identification de la position de système de spin au sein d'un polymère peptidique pour un même type d'acide aminé (**figure 3.11**).

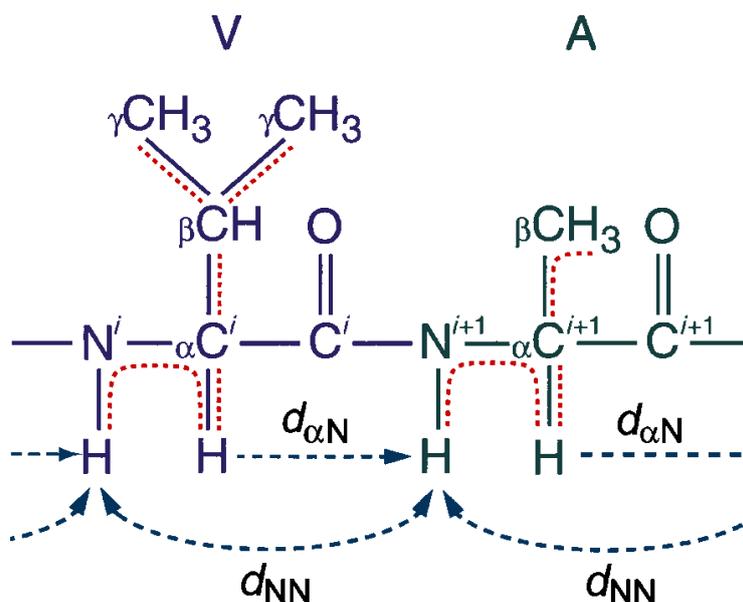


Figure 3.11 : Attribution séquentielle des protéines par RMN 1H

Le schéma montre la structure chimique d'un segment de dipeptide valine-alanine (V-A) dans une chaîne polypeptidique. Les traits en pointillés rouges relient des groupes d'atomes d'hydrogène qui sont séparés par au plus trois liaisons chimiques et peuvent donc être connectés par des couplages spin-spin scalaires. Les flèches en pointillés bleus lient les paires d'atomes hydrogène dans les résidus d'acides aminés voisins qui sont séparés par de courtes distances dans l'espace, $d_{\alpha N}$ et d_{NN} , et peuvent donc être reliés par des *NOE* séquentiels (Adapté de Wüthrich, 1986) (modifié d'après Wüthrich, 2003).

Les déplacements chimiques, une fois attribués, vont permettre de caractériser les structures secondaires (hélice α et feuillet β) puisqu'ils sont très sensibles à l'environnement des protons (cf. p.61) et par conséquent sont dépendants des conformations locales du squelette peptidique. Ainsi, chaque structure secondaire va conduire à des valeurs de déplacements chimiques qui lui sont caractéristiques.

On peut calculer pour chaque résidu le déplacement chimique secondaire qui est défini comme la différence entre le déplacement chimique observé (δ_{obs}), d'un proton comme le proton α ($^1\text{H}_\alpha$) ou d'un carbone tel que le carbone α , le carbone β et le CO ($^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$ et $^{13}\text{C}'$), et le déplacement chimique correspondant du même acide aminé en pelote statistique ou *random coil* (δ_{rc}) [$\Delta\delta = \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{rc}}$] (Wishart *et al.*, 1991a ; Wishart *et al.*, 1991b ; Wishart *et al.*, 1992 ; Wishart et Sykes, 1994 ; Wishart, 2011).

Génération des contraintes structurales

L'attribution complète des déplacements chimiques des protons des peptides/protéines est fondamentale pour la modélisation moléculaire puisqu'elle permet en partie de fournir les contraintes structurales. En effet, les déplacements chimiques des protons α (H_α) peuvent servir à prédire les valeurs d'angles dièdres (ϕ et ψ) par le programme TALOS (*Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity*) (Cornilescu *et al.*, 1999) et ceci à partir d'une base de données de protéines de structure connue. Ce programme recherche dans un premier temps des similarités de séquence sur un triplet de résidus entre la protéine ou le peptide d'intérêt et des protéines de la base de données et combine les similarités de séquence à une comparaison des déplacements chimiques (H_α , C_α , C_β , CO et N). Ensuite, ce logiciel présente les 10 meilleurs résultats pour le résidu qui se trouve au centre du triplet et propose des valeurs moyennes et leurs déviations standard pour les angles dièdres qui seront visualisées sur un diagramme de Ramachandran et validées (seules les solutions acceptables seront gardées) (Cornilescu *et al.*, 1999).

En plus des informations apportées sur l'ordre des systèmes de spin, le couplage dipolaire permet aussi de fournir des informations sur la géométrie locale ou globale du polypeptide. Ces couplages sont classés en *NOE séquentiels* pour les corrélations inter-résidus ($i, i+1$), à *moyenne portée* pour les corrélations inter-résidus non séquentielles entre les résidus ($i, i+2$), ($i, i+3$) et ($i, i+4$) et à *longue portée* pour les corrélations qui s'établissent entre les résidus ($i, i+n$; $n>4$). En fonction du type de repliement de la chaîne peptidique, certains protons se retrouvent très proches dans l'espace et forment des pics de corrélation (*NOE*) caractéristiques du type de repliement (Wuthrich, 1986).

Ces interactions dipolaires sont essentielles lors du calcul de structure puisqu'elles apportent des informations sur la structure locale ou même globale des peptides/protéines. Cependant, l'utilisation de ces interactions nécessite leur conversion en contraintes structurales exploitables par les programmes de modélisation. Cette conversion implique l'intégration des pics de corrélation (par l'utilisation de programme comme NMRVIEW) ce qui permettra de retrouver l'intensité (I) de chaque massif (ce qui correspond à son volume). Cette intensité est reliée à la distance (r) qui sépare deux noyaux couplés (i et j) par la relation : $I_{ij}/I_{ref} = (r_{ref}/r_{ij})^6$ où I_{ref} représente l'intensité d'un pic *NOE* de référence correspondant à une distance fixe (r_{ij}). Ainsi, chaque pic de corrélation d'un spectre NOESY va fournir une distance qui sera utilisée comme une contrainte expérimentale dans le calcul de structure.

La notation des distances entre protons couplés de façon dipolaire se fait en précisant le type de proton impliqué (proton α , proton β ou proton amide) ainsi que la position du résidu dans la séquence ($i, i+1$, etc.). Afin de simplifier cette notation, pour les *NOE* séquentiels, la position ($i, i+1$) n'est pas mentionnée. Ainsi, les distances $d_{\alpha N}$ et $d_{\alpha N}(i, i+2)$ indiquent un *NOE* séquentiel et un *NOE* à moyenne portée, respectivement, entre le proton α et le proton amide. Chaque type de structure secondaire se définit par des distances particulières dépendant du repliement local du squelette peptidique. Ces distances séquentielles et à moyenne portée sont représentées dans la **figure 3.12** et les valeurs de ces distances sont données pour chaque type de structure secondaire dans le **tableau 3.4** (Wüthrich, 1986).

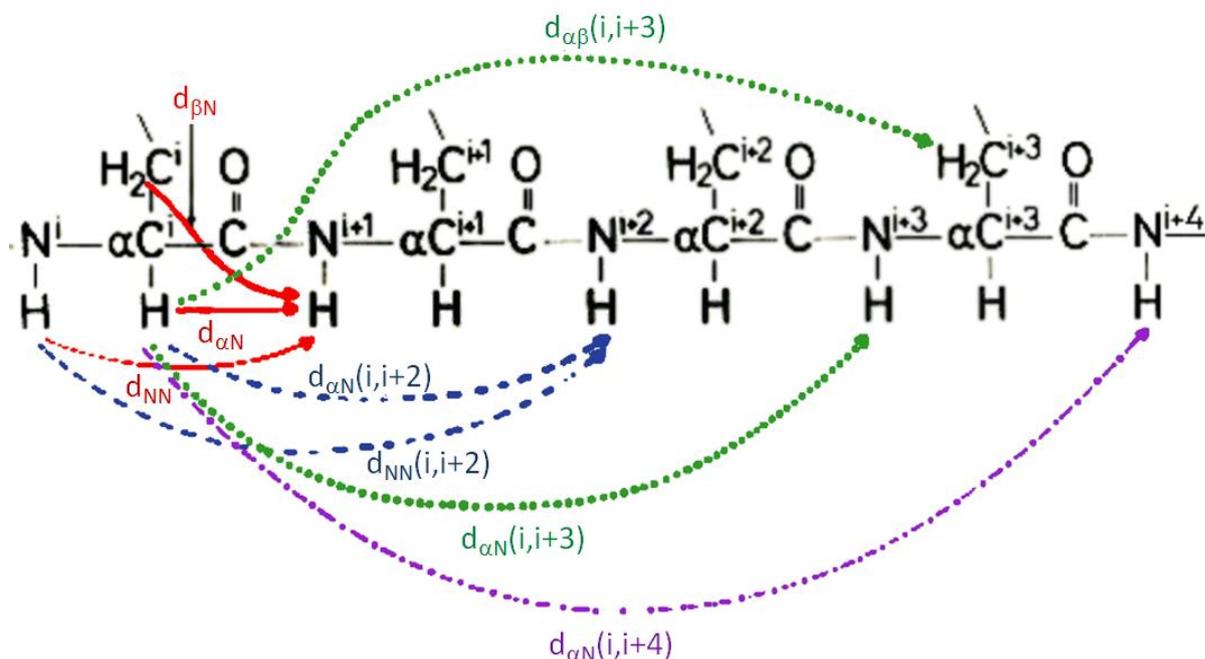


Figure 3.12 : Distances séquentielles et à moyenne portée ^1H - ^1H dans une chaîne polypeptidique (modifié d'après Wüthrich, 1986)

Tableau 3.4 : Distances séquentielles courtes et à moyenne portée ^1H - ^1H dans les structures secondaires de polypeptide (d'après Wüthrich, 1986)

Distance	Hélice α	Hélice 3_{10}	Feuillet β antiparallèle	Feuillet β parallèle	Coude β de type I ^a	Coude β de type II ^a
$d_{\alpha\text{N}}$	3,5	3,4	2,2	2,2	3,4 3,2	2,2 3,2
$d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$	4,4	3,8			3,6	3,3
$d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$	3,4	3,3			3,1-4,2	3,8-4,7
$d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$	4,2					
d_{NN}	2,8	2,6	4,3	4,2	2,6 2,4	4,5 2,4
$d_{\text{NN}}(i,i+2)$	4,2	4,1			3,8	4,3
$d_{\beta\text{N}}^{\text{b}}$	2,5-4,1	2,9-4,4	3,2-4,5	3,7-4,7	2,9-4,4 3,6-4,6	3,6-4,6 3,6-4,6
$d_{\alpha\beta}(i,i+3)^{\text{b}}$	2,5-4,4	3,1-5,1				

^a pour les coudes, le premier des deux nombres concerne la distance entre les résidus 2 et 3, le second celle entre les résidus 3 et 4. L'intervalle indiqué pour $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$ correspond aux distances adoptées si ψ varie entre -180 et $+180^\circ$.

^b les intervalles donnés correspondent aux distances adoptées par le proton méthine β si χ^1 varie entre -180 et $+180^\circ$.

L'exploration des effets *NOE* qui reflètent la distance entre deux protons proches dans l'espace s'avère aussi importante pour la caractérisation de la conformation globale des peptides/protéines puisque le repliement tridimensionnel de la chaîne polypeptidique est susceptible de rapprocher deux protons appartenant à deux résidus qui sont éloignés dans la structure primaire, comme ces deux protons de la **figure 3.13** qui se trouvent aux deux extrémités C- et N-terminale et qui donnent un pic de corrélation dipolaire (*NOE*). Ce dernier est classé comme un *NOE* à longue portée ($i, i + n ; n > 4$). Ces *NOE* sont indispensables pour la définition des structures tertiaires des protéines/peptides.

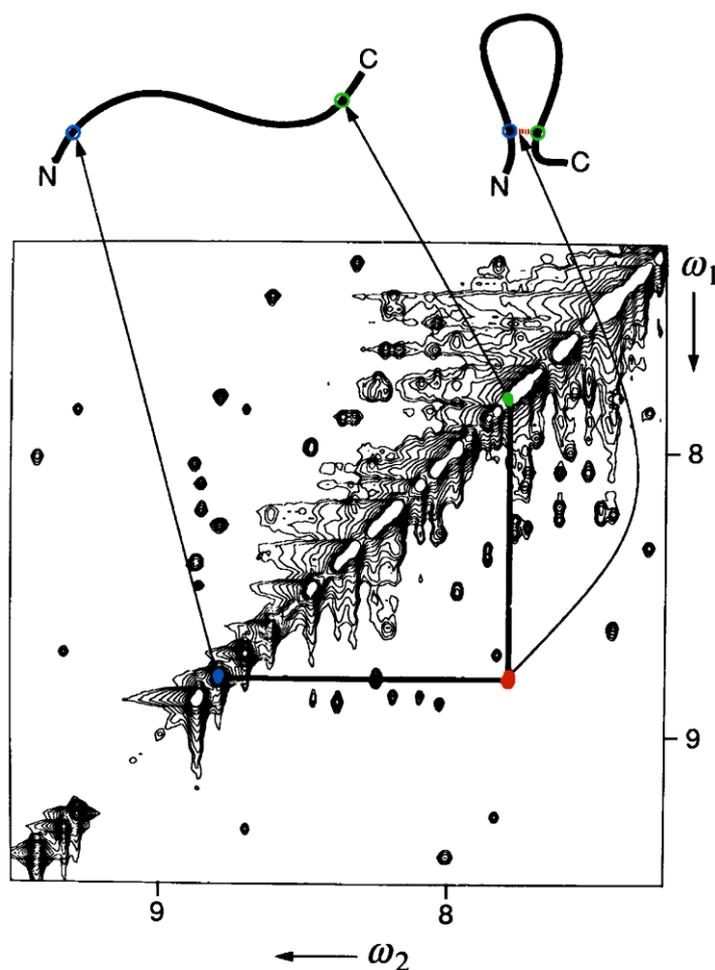


Figure 3.13 : Schéma indiquant les relations entre un spectre expérimental NOESY 2D (^1H - ^1H) et un polypeptide avec les extrémités de la chaîne indiquées par N et C (modifié d'après Wüthrich, 2003)

Les deux protons qui se trouvent aux extrémités N- et C-terminales de la chaîne peptidique sont indiqués par des cercles vert et bleu.

Ces protons sont reliés par un *NOE* à longue portée (en rouge) lorsqu'ils sont rapprochés dans l'espace suite au repliement de la chaîne polypeptidique.

Calcul de structure

Le calcul de structure constitue la dernière étape dans la détermination de la structure tridimensionnelle des peptides/protéines. Ce calcul utilise les données expérimentales (interactions dipolaires proton-proton, déplacements chimiques...) fournies par l'exploration des spectres RMN sous forme de contraintes structurales pour générer un ensemble de structures. Cependant, ces contraintes structurales représentées par les contraintes de distance et d'angle dièdre sont insuffisantes par elles-mêmes pour la caractérisation exacte de la structure des peptides/protéines et nécessitent en plus des informations concernant la topologie propre à ces molécules qui désignent l'enchaînement de tous les atomes des résidus d'acides aminés, leur type, leur charge et leur masse. L'obtention de ces informations de topologie moléculaire nécessite d'introduire la séquence du peptide ou de la protéine dans le calcul de structure.

L'objectif du calcul de structure est de caractériser les propriétés conformationnelles des peptides/protéines dans leur état le plus stable. Pour cela, il est nécessaire d'explorer un ensemble de conformations (qui se distinguent par les coordonnées cartésiennes de chaque atome, par les angles de valence et les angles dièdres) afin d'optimiser l'énergie globale et retrouver ainsi la conformation la plus stable de ces molécules.

Ainsi, le calcul de structure va tenter de retrouver ces paramètres qui permettent de minimiser l'énergie totale en respectant la géométrie du squelette peptidique de ces molécules tout en satisfaisant les contraintes expérimentales. Il existe plusieurs programmes qui exploitent les données RMN et qui génèrent un ensemble de structures de plus basse énergie (les plus stables) comme le logiciel CNS (*Crystallography and NMR System*). Ce logiciel de modélisation moléculaire est utilisé dans la détermination de structures tridimensionnelles des peptides/protéines résolues par RMN ou par radiocristallographie (Brunger *et al.*, 1998).

Les peptides et les protéines sont constitués d'un ensemble cohérent d'atomes qui subissent des forces attractives et répulsives. Il est possible avec les progrès de la mécanique moléculaire de calculer l'énergie d'interaction entre ces atomes dans un champ de force empirique. Cette énergie d'interaction empirique ($E_{empirical}$) se définit comme la somme d'une série de fonctions énergétiques ($E_{empirical} = E_{bond} + E_{angle} + E_{dihedral} + E_{impr} + E_{vdw} + E_{elect}$). Cette énergie est en fait la somme de deux termes, un terme d'énergie qui prend en considération les interactions entre atomes non liés c'est-à-dire les interactions de van der Waals (E_{vdw}) et les interactions électrostatiques (E_{elect}) et un terme qui définit la géométrie covalente de la molécule en prenant en compte toutes les interactions entre atomes liés et qui comprend l'énergie de liaison (E_{bond}), l'énergie des déformations d'angle de valence (E_{angle}), l'énergie de

torsion ($E_{dihedral}$) et l'énergie des angles impropres (E_{impr}). À cette énergie empirique de la molécule, on ajoute un troisième terme énergétique qui représente l'énergie des contraintes expérimentales (déduites des expériences RMN) ou énergie effective ($E_{effective} = E_{NOE} + E_{torsion}$) qui est la somme de l'énergie des angles dièdres ($E_{torsion}$) et l'énergie des distances entre protons couplés de façon dipolaire (E_{NOE}).

Comme les conformations les plus stables correspondent aux conformations de plus basse énergie, on procède à la minimisation de l'énergie globale qui comprend l'énergie interne et l'énergie effective, et ceci en faisant varier *in silico* la température. Des températures très élevées sont généralement utilisées pour permettre au système d'explorer l'ensemble de l'espace conformationnel et franchir ainsi les barrières énergétiques. Ensuite, un algorithme utilisant un refroidissement progressif permet au système d'atteindre le minimum d'énergie globale. Cette simulation constitue le principe de la méthode du recuit simulé (*Simulated Annealing Method*) utilisée par le programme de modélisation CNS qui utilise les fichiers de contraintes de distance et d'angle dièdre comme *des fichiers d'entrée* pour générer *des fichiers de sortie* contenant toutes les coordonnées cartésiennes de tous les atomes de ces molécules. Pour tenir compte de la variabilité conformationnelle, un grand nombre de structures est calculé. 10 à 15 % des structures de plus basse énergie sont sélectionnées et analysées par des logiciels de visualisation moléculaire comme MOLMOL (MOLEcule analysis and MOLEcule display) (Koradi *et al.*, 1996) ou PyMOL (Schrödinger, 2010).

Compte tenu du nombre de variables, certaines contraintes peuvent conduire à des contacts trop proches ou trop éloignés. Ce rapprochement est défavorable sur le plan énergétique et conduit à des valeurs importantes de l'énergie totale. Cette hausse d'énergie est considérée comme une *violation* de distance et l'écart de la distance « violée » est donnée afin qu'il soit rectifié. L'analyse et la correction de ces violations permettent de converger vers les conformations les plus stables. Dans la littérature, ces écarts doivent être généralement inférieurs à 0,5 Å pour les contraintes de distance et inférieures à 10° pour les contraintes d'angle de torsion.

L'analyse de la qualité des structures conservées après la correction des violations des contraintes est essentielle pour leur validité. Cette analyse se fait par l'utilisation d'un programme tel que PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1993). Ce programme permet de vérifier la qualité de la géométrie du squelette peptidique en reportant les valeurs des angles de torsion (ϕ et ψ) des structures calculées sur la carte de Ramachandran qui présente des valeurs d'angles standard. En fonction de la répartition des paires d'angles (ϕ et ψ) entre les

différentes zones de cette carte (favorable, permise, non permise ou interdite), des statistiques sont calculées pour les résidus qui constituent cette protéine ou ce peptide. Les structures de meilleure qualité doivent avoir l'ensemble de leurs résidus dans la zone favorable.

Un deuxième paramètre appelé *RMSD* (valeur de l'écart quadratique moyen des coordonnées) qui représente l'écart entre les structures calculées, est aussi largement utilisé puisqu'il permet d'évaluer la convergence de la simulation. Le *RMSD* est estimé suite à la superposition des structures calculées. Cet écart, qui est donné en unités angström (Å), peut être mesuré pour le squelette peptidique de ces structures, les atomes « lourds »²¹ (C, O, N, S...) ou pour toute autre partie de ces structures. Les régions N- et C-terminales des peptides/protéines sont généralement non structurées et flexibles, c'est pourquoi elles présentent des valeurs élevées de *RMSD*.

2.3 Etude de l'interaction moléculaire d'un ligand avec un récepteur protéique

L'étude des interactions protéine-protéine, protéine-acide nucléique et protéine-ligand, qui sont essentielles à de nombreux mécanismes cellulaires, est d'un grand intérêt aussi bien en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée et notamment dans le domaine pharmaceutique. La caractérisation structurale de ces interactions, pour laquelle de nombreuses techniques RMN sont envisageables, est indispensable à la compréhension de leur mécanisme de régulation en permettant d'identifier les sites (résidus d'acides aminés dans le cas des protéines) qui y sont impliqués. La RMN fournit un outil puissant pour ce genre d'analyse puisque l'interaction d'un ligand ou d'une macromolécule à son récepteur protéique, de faible ou de forte affinité, altère l'environnement chimique des noyaux à ces sites d'interaction et perturbe ainsi leur déplacement chimique.

On peut notamment citer l'expérience de différence de transfert de saturation (STD-NMR), l'expérience des *NOE* transférés (tr-NOESY) et l'expérience HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Le choix de la technique dépend de l'objectif recherché et de la constante d'affinité.

En conséquence, si notre intérêt est de déterminer les éléments structuraux d'un ligand qui présente une faible affinité pour son récepteur protéique, il sera judicieux d'utiliser la technique STD-NMR (Mayer et Meyer, 1999 ; Mayer et Meyer, 2001) et/ou la tr-NOESY (Clare, Gronenborn, 1982 ; Clare, Gronenborn, 1983) qui sont largement utilisées dans de nombreux domaines et notamment lors du criblage de médicaments ou de composés organiques. Le principe de la STD-NMR s'appuie sur un transfert de saturation du récepteur

²¹ Dans les programmes de visualisation moléculaire (MOLMOL et PyMOL), le terme « lourd » est utilisé pour désigner les atomes autres que l'hydrogène.

protéique au ligand lié, qui s'échange avec le ligand libre et se retrouve dans la solution où il est détecté. Les protons du ligand qui sont impliqués dans cette interaction vont donner des signaux RMN d'intensité variable. Cette variabilité dépend de la proximité de ces protons avec le récepteur protéique : plus le proton est proche plus fort sera son signal RMN, ce qui permet de cartographier l'épitope de liaison du ligand (**figure 3.14**).

Par contre, si nous nous intéressons à l'analyse structurale du site de liaison du récepteur, l'HSQC est alors la technique la mieux adaptée et le marquage isotopique (^{13}C et/ou ^{15}N) préalable de la protéine doit être envisagé. Ceci s'avère utile dans le cas de l'interaction d'un ligand qui présente une forte affinité pour son récepteur (pour revue (Bhunia *et al.*, 2012 ; Mayer et Peters, 2003 ; Pellicchia *et al.*, 2002)).

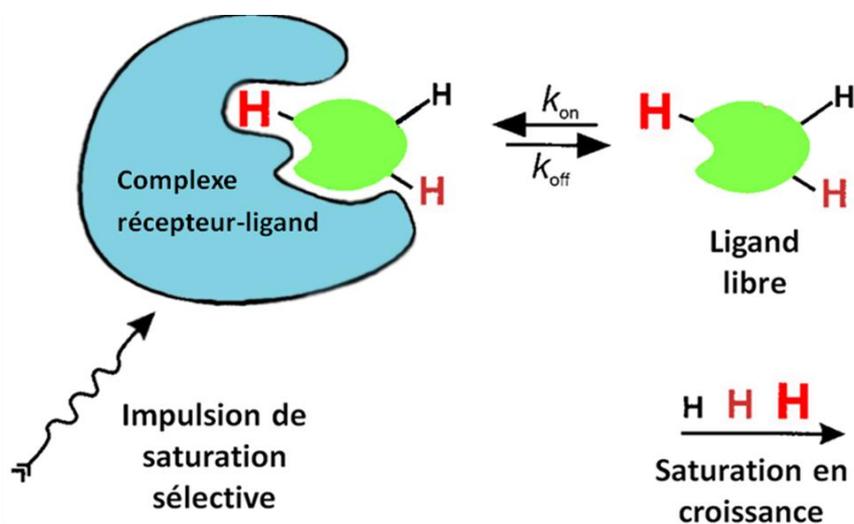


Figure 3.14 : Illustration de cartographie de groupe épitope pour un ligand en échange rapide entre un état lié et un état libre (d'après Mayer et Meyer, 2001)

Partie 2 :
Travaux expérimentaux
&
Résultats

Chapitre IV :

Matériel & Méthodes

1. Choix des peptides K26D, K26D-P et M19T

Le premier peptide que j'ai étudié est le peptide K26D issu du domaine C-terminal de la Cx43. Le choix de la séquence du peptide K26D a été effectué en s'appuyant sur les résultats de Giepmans *et al.* (2001b) qui ont souligné une séquence portant une activité de liaison à la tubuline, située dans la région juxta-membranaire (séquence : L228-C260)²² du domaine C-terminal de Cx43. L'extrémité N-terminale de cette région contient six résidus très hydrophobes (LFYVFF). Pour prévenir les phénomènes d'agrégation, nous avons fait commencer la synthèse peptidique à partir du résidu K234. En outre, le dernier résidu cystéine (C260) de la séquence a été éliminé afin d'éviter la formation de ponts disulfures. La séquence du peptide K26D a donc été synthétisée comme suit : ²³⁴KGVKDRVKGKSDPYHATSGALSPAKD²⁵⁹ (**figure 4.1**).

Un deuxième peptide a également été synthétisé, appelé K26D-P de séquence identique à celle du peptide K26D ²³⁴KGVKDRVKGKSDP_pYHATSGALSPAKD²⁵⁹ mais où le résidu Y247 a été phosphorylé (**figure 4.1**).

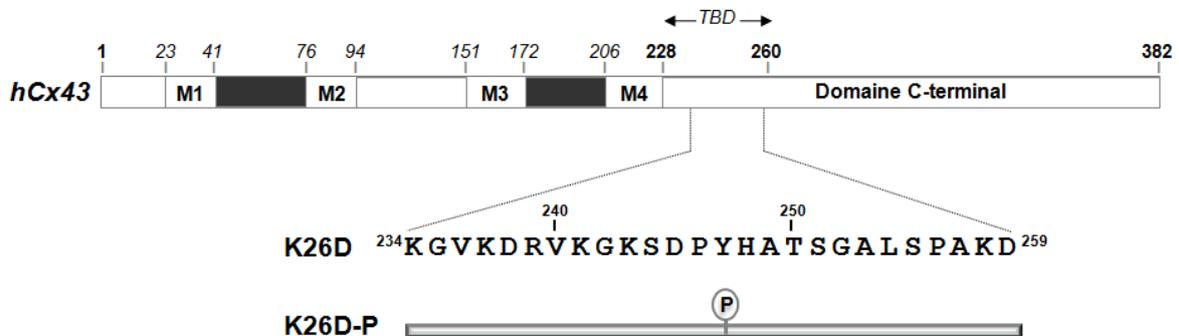


Figure 4.1 : Représentation schématique de la hCx43 et des peptides K26D et K26D-P

La connexine43 humaine (hCx43) possède quatre domaines transmembranaires (M1-M4) et trois domaines cytoplasmiques. Les peptides font partie d'une région de l'extrémité C-terminale de la Cx43 supposée se lier à la tubuline (TBD : domaine de liaison à la tubuline).

²² Dans les articles de Giepmans *et al.*, (2001b) et Dai *et al.*, (2007), une erreur apparaît dans la numérotation des acides aminés du domaine juxta-membranaire de la Cx43, C260 étant appelé C263.

Dans ce travail, un troisième peptide a été utilisé dans le but d'apporter des éléments à la compréhension de la compétition entre la Cx43 et des facteurs de transcription Smad2/3 pour leur liaison au système tubuline/microtubules. Il a été proposé que cette compétition pourrait impliquer d'une part la région ²³⁴KGVKDRVKGK²⁴³ de la Cx43 (incluse dans la séquence du peptide K26D) et d'autre part le domaine *MH2* de la protéine Smad2 qui correspond à sa région 274 à 467 (Dai *et al.*, 2007).

Notre premier objectif était la recherche de similarité de séquence entre le peptide K26D et le domaine *MH2* de Smad2. Nous avons utilisé pour cela le programme SIM qui réalise un alignement local de deux séquences en recherchant les sous-séquences les plus similaires (Huang et Miller, 1991). Il est intéressant de noter que d'une part, nous avons obtenu un alignement sans *gap* (sans insertion ni délétion) dans lequel cinq résidus (V240, K241, G242 Y247 et P256) du peptide K26D étaient alignés avec la région M419-P435 du domaine *MH2* de Smad2. D'autre part, cette région (M419-P435) est incluse dans la boucle L3 du domaine *MH2* de Smad2 qui est prédite de former une structure exposée au solvant et pourrait donc constituer un site d'interaction protéine-protéine (Shi *et al.*, 1997). Cette boucle correspond à une région qui est hautement conservée à l'intérieur du domaine *MH2* des protéines Smad (Shi *et al.*, 1997). Elle est cruciale pour la liaison des protéines R-Smad *aux récepteurs transmembranaires* (Lo *et al.*, 1998) et à *d'autres protéines Smad2* où elle interagit avec leurs extrémités C-terminales phosphorylées (Wu *et al.*, 2001).

À partir de ce résultat, nous avons fait synthétiser un peptide correspondant à la séquence ⁴¹⁶MSFVKGWGAEYRRQTVTST⁴³⁴ du domaine *MH2* de Smad2, que nous avons appelé M19T. Il faut noter que ce peptide s'aligne sur quatre résidus (V419, K420, G421 et Y426) avec le peptide K26D. Le prolongement du peptide M19T du côté C-terminal aurait pu entraîner la formation de ponts disulfures, en raison de la présence d'un résidu cystéine (C436), ainsi que des phénomènes d'agrégation, de par la présence de résidus très hydrophobes (P435 et W437) (**figure 4.2**).

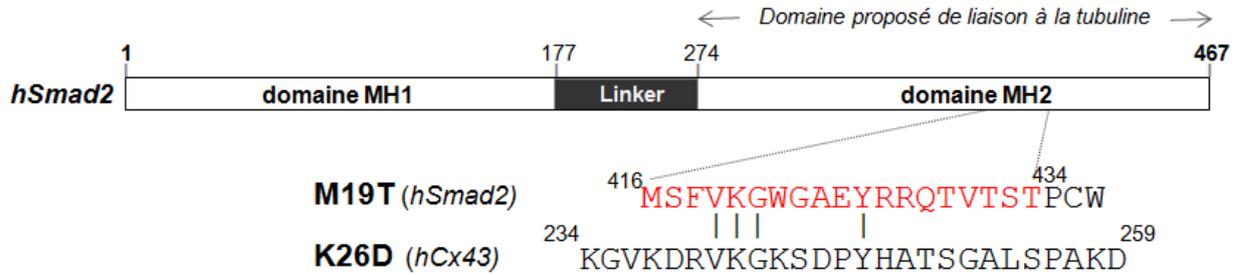


Figure 4.2 : Représentation schématique de la protéine hSmad2 et de l’alignement des peptides M19T-K26D

Représentation schématique de la protéine Smad2 humaine (hSmad2) selon Dai *et al.* (2007) (en haut). Alignement sans *gap* du peptide M19T (en rouge) avec le peptide K26D qui révèle la présence de quatre résidus en position identique dans ces deux peptides. Cet alignement a été réalisé par le programme SIM (Huang et Miller, 1991) (en bas).

Les séquences et les numérotations des acides aminés des peptides K26D et M19T ont été utilisées telles qu’elles sont dans les séquences de référence de la Cx43 et de Smad2 (NCBI NP_000156.1 et AAC39657.1, respectivement) qui sont déposées dans la banque de séquences protéiques : GenPept (NCBI).

Les peptides ont été achetés auprès de « PolyPeptide Laboratories » (Strasbourg, France). La pureté et l’intégrité des peptides ont été vérifiées par spectrométrie de masse. Les trois peptides ont été dissous dans de l’eau à une concentration de 4 mM. Les solutions reconstituées ont été fractionnées en aliquotes de 10 μ L et ont été conservées à -20°C pour leur utilisation ultérieure.

2. Purification de la tubuline

La tubuline purifiée à partir d’extrait brut de cerveau de mouton a été fractionnée en aliquotes et conservée à -80°C dans un tampon MES-KOH (acide 2-(*N*-morpholino)éthane-sulfonique ajusté à pH 6,8 avec du KOH 5 M) à 50 mM contenant de l’EGTA à 0,5 mM, du MgCl_2 à 0,25 mM, de l’EDTA à 0,5 mM, du GTP à 0,1 mM et du glycérol à 33 % (Castoldi et Popov, 2003). Avant chaque utilisation du stock de tubuline (conservé à -80°C) un cycle supplémentaire de polymérisation et de dépolymérisation est réalisé de manière à ne conserver que la tubuline fonctionnelle. La concentration de la tubuline a été mesurée par méthode spectrophotométrique (Ultrospec 3000 ; GE Healthcare) à 278 nm en utilisant un coefficient d’extinction de $1,2 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^2$ (Detrich et Williams, 1978).

3. Etude de l’impact du peptide K26D sur la polymérisation des microtubules

Nous avons testé dans un premier temps l’impact du peptide K26D sur la dynamique

de la polymérisation des microtubules. La tubuline a été polymérisée selon le protocole de polymérisation des microtubules *in vitro* dérivé de Chernov *et al.* (2008). Cette polymérisation, suivie par turbidimétrie à 340 nm dans un spectrophotomètre thermostaté (Ultrospec 3000 ; GE Healthcare), a été effectuée en absence (tube témoin) et en présence de différentes concentrations de ce peptide (tubes échantillons). Dans le tube témoin, la tubuline à 30 μM a été polymérisée à 37 °C dans le tampon MES-KOH à 50 mM (pH 6,8) en présence de GTP à 1 mM (nucléotide à guanine indispensable à la polymérisation), de MgCl_2 à 2 mM (Mg^{2+} : cations divalents qui participent à la coordination des phosphates du nucléotide guanidique) et de glycérol à 25 % (v/v) (facteur de promotion de la polymérisation des microtubules). Il faut noter que les échantillons doivent être maintenus dans la glace et que la tubuline et le GTP sont toujours ajoutés en dernier.

Les mêmes conditions ont été respectées pour les tubes échantillons qui contiennent, en plus de la tubuline à la même concentration que dans le tube témoin, des concentrations variables du peptide K26D (20, 100 et 200 μM).

4. Étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules par co-sédimentation

Parmi les méthodes biochimiques qui permettent la caractérisation des interactions protéine-ligand, nous avons choisi la co-sédimentation dans notre étude pour sa simplicité. Cette technique consiste à faire sédimenter le ligand (partenaire de faible masse moléculaire) suite à son interaction avec son récepteur protéique qui présente une masse moléculaire élevée. Dans le cas présent ce sont les microtubules qui sédimenteront sous l'effet d'un champ gravitationnel. La question est donc de détecter dans le culot la présence éventuelle du peptide K26D.

Pour cette raison, nous avons réalisé une polymérisation de la tubuline en présence et en absence du peptide K26D suivie d'une séparation des microtubules des surnageants par centrifugation puis analyse des fractions microtubules et surnageants par électrophorèse 1D en condition dénaturante sur gel de polyacrylamide en présence de DodécylSulfate de Sodium (*SDS-PAGE*) à 12 %, ce qui permettra d'évaluer la présence du peptide K26D dans le surnageant et/ou le culot.

La tubuline a été polymérisée à une concentration de 20 μM dans 20 μL de tampon MES-KOH à 50 mM (pH 6,8) contenant du MgCl_2 à 4 mM, du KCl à 100 mM, du GTP à 1 mM et du glycérol à 10 % (v/v) pendant 30 min à 37 °C. Du taxol à 20 μM a été ajouté au tampon de polymérisation afin de stabiliser les microtubules. La polymérisation a été réalisée

dans deux tubes échantillons en présence et en absence du peptide K26D qui a été utilisé à une concentration de 600 μM . Afin de s'assurer que le peptide K26D ne s'agrège pas, ce qui provoquerait sa sédimentation, nous avons ajouté un troisième tube témoin qui ne contient que le tampon de polymérisation et le peptide K26D à la même concentration que les deux tubes échantillons. À la fin de la polymérisation, une centrifugation ($25\,000 \times g$; 15 min à $37\text{ }^\circ\text{C}$) a été réalisée pour ces trois tubes.

Cette centrifugation permet de séparer les microtubules (tubuline polymérisée) qui sédimentent dans le culot, de la tubuline non polymérisée, qui reste dans le surnageant. Après centrifugation, les culots récupérés ont été lavés deux fois avec du MES-KOH 50 mM à pH 6,8 (chaud) puis les culots ont été remis en suspension dans le bleu de charge 1X pour l'électrophorèse 1D-SDS-PAGE (Tris 50 mM à pH 6,8 ; dithiothréitol 100 mM ; SDS 2 % ; bleu de bromophénol 0,1 % ; glycérol 10 % (v/v)). Un volume de bleu de charge 4X équivalent du 1/3 du volume de chaque surnageant a été ajouté pour arriver à une concentration finale de 1X. Ces culots et surnageants ont été mis à bouillir à $100\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 5 minutes.

Ensuite, 10 μL de chaque échantillon et témoin ont été déposés sur le gel de polyacrylamide appelé *gel de dépôt ou de concentration* (Tris-HCl 1 M, pH 6,8 ; acrylamide/bisacrylamide 30 % ; SDS 20 % ; persulfate d'ammonium ou APS 10 % ; N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine ou TEMED) qui surmonte un deuxième gel appelé *gel de séparation* (acrylamide/bisacrylamide 30 % ; Tris-HCl 1 M à pH 8,8 ; SDS 20 % ; APS 10 % ; TEMED). La séparation des échantillons a été réalisée dans un tampon de migration Tris-glycine 1X (Tris 25 mM à pH 8,3 ; glycine 250 mM ; SDS 0.1 %) sous l'effet d'un champ électrique (25 mA par gel) pendant 45 minutes. La révélation de la tubuline et du peptide a été réalisée par coloration au bleu de Coomassie.

5. Caractérisation structurale de l'interaction des peptides avec la tubuline

Les techniques biochimiques peuvent caractériser les interactions protéine-ligand mais ne peuvent pas fournir les éléments structuraux de ces interactions. La caractérisation structurale à l'échelle atomique de ces interactions est rendue possible par la RMN.

Dans ce travail, l'étude structurale des interactions entre la tubuline et les peptides (K26D, K26D-P et M19T) a impliqué l'utilisation de deux expériences RMN : une expérience 2D homonucléaire (^1H - ^1H) s'appuyant sur les *NOE* transférés appelée *tr-NOESY* (Clare, Gronenborn, 1982; Clare, Gronenborn, 1983) et une expérience 1D s'appuyant sur un transfert de saturation appelée *STD-NMR* (Mayer et Meyer, 2001).

L'expérience tr-NOESY permet de déterminer la structure tridimensionnelle d'un ligand en interaction avec son récepteur protéique à condition d'être dans la bonne gamme de constante d'interaction. L'analyse structurale du peptide K26D en interaction avec la tubuline a été réalisée à partir du spectre de la tr-NOESY de ce peptide en présence de la tubuline. Cette analyse a été effectuée selon le protocole standard de détermination de la structure tridimensionnelle par RMN comme décrit dans le chapitre précédent. Cette analyse implique plusieurs étapes : préparation d'échantillon, acquisition des spectres, traitement de signal, attribution des déplacements chimiques et génération des contraintes structurales qui ont été utilisées pour la modélisation moléculaire (cf. **figure 3.9**).

5.1 Préparation des échantillons

Tous les échantillons utilisés pour les expériences RMN ont été préparés dans 50 mM de tampon PIPES deutéré (pipérazine-1,4-bis (2-éthanesulfonique) ajusté à pH 6,4 avec du KOH 10 M) à des volumes de 60 μ L. L'utilisation du tampon deutéré permet d'éviter que les protons du tampon ne saturent le signal RMN (concentration de l'ordre de la dizaine de millimolaire) par rapport au peptide (concentration de l'ordre de la centaine de micromolaire). Pour cette raison, nous avons par ailleurs procédé au changement de tampon de la tubuline pour éliminer son tampon MES-KOH qui n'est pas deutéré, et ceci pour toutes les manipulations de la RMN qui ont impliqué l'utilisation de la tubuline. Cette expérience a été réalisée sur des petites colonnes de chromatographie d'exclusion moléculaire (colonne Micro Bio-spin P30). La limite d'exclusion du gel de ces colonnes de chromatographie est de 40 kDa, selon le protocole fourni par le laboratoire BIO-RAD. Ces colonnes ont été équilibrées avec du PIPES deutéré 50 mM afin de récupérer la tubuline dans ce tampon deutéré.

Le DSS a été utilisé comme une référence externe pour les déplacements chimiques des protons.

5.2 Acquisition des spectres

Après la préparation des échantillons, nous avons procédé à l'enregistrement des spectres RMN qui ont été acquis à deux températures différentes (9 °C et 20 °C) sur un spectromètre RMN Bruker Avance 600 MHz muni d'une cryosonde. La température basse de 9 °C a été utilisée pour tous les échantillons RMN de façon à conserver la stabilité de la tubuline durant l'enregistrement des expériences RMN 1D (1D- 1 H et STD-NMR) et 2D (tr-NOESY) qui se faisaient le plus souvent à la chaîne. Cependant cette température était inconvenable pour l'échantillon contenant les microtubules car le froid provoque leur

dépolymérisation, c'est pourquoi nous avons utilisé la température de 20 °C pour cet échantillon. Les spectres ont été traités et visualisés à l'aide du logiciel Topspin 2.1 (Bruker) et analysés avec le programme NMRVIEW 5.2 (Johnson, Blevins RA, 1994). Avant l'acquisition de toutes les expériences, une suppression du signal de l'eau a été réalisée avec la séquence ES (Hwang, Chaka, 1995) ou la séquence WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992).

La caractérisation structurale de l'interaction des peptides (K26D, K26D-P et M19T) avec leur récepteur protéique (tubuline) requiert l'identification des déplacements chimiques de tous les protons de ces peptides.

Il est bien établi que l'acquisition des deux expériences 2D homonucléaires (^1H - ^1H) TOCSY (Braunschweiler et Ernst, 1983) et NOESY (Kumar *et al.*, 1980) est généralement suffisante à la résolution de la structure tridimensionnelle des protéines qui possèdent une faible masse moléculaire (inférieure à 10 kDa) (Malliavin et Dardel, 2002, Whitford, 2005) ou des peptides, mais s'avère insuffisante pour les protéines de masse moléculaire supérieure à cette valeur. Pour cela, nous avons réalisé l'enregistrement de spectre TOCSY avec un temps de mélange de 80 ms et de spectre NOESY avec 200 ms de temps de mélange. Ces deux expériences ont été enregistrées pour les peptides seuls (K26D, K26D-P et M19T) à une concentration de 800 μM .

Par ailleurs, les expériences tr-NOESY (Clore, Gronenborn, 1982; Clore, Gronenborn, 1983) et STD-NMR (Mayer et Meyer, 2001) ont été utilisées pour l'étude de l'interaction entre les peptides (K26D, K26D-P et M19T) et la tubuline. Les peptides ont été analysés à une concentration de 800 μM en présence de la tubuline à 40 μM ce qui correspond à un rapport molaire de 20:1 pour le complexe peptide:tubuline.

L'expérience tr-NOESY a été réalisée avec deux temps de mélange (150 et 200 ms) pour le peptide K26D et un temps de mélange de 200 ms pour les peptides K26D-P et M19T.

Des spectres témoins de tr-NOESY et de STD-NMR ont été acquis en présence d'albumine sérique bovine (BSA) à la place de la tubuline et en utilisant des conditions expérimentales similaires pour les peptides K26D et M19T.

5.3 Attribution des spectres

La détermination de la structure tridimensionnelle du peptide K26D lié à la tubuline ainsi que la caractérisation des sites d'interaction des peptides (K26D, K26D-P et M19T) impliquent une attribution complète des déplacements chimiques des protons (^1H) de ces peptides.

Ainsi, nous avons procédé à l'attribution complète des résonances des protons des peptides K26D, K26D-P et M19T en utilisant la procédure standard (Wüthrich, 1986) qui s'appuie sur l'identification des systèmes de spin de tous les résidus d'acides aminés à partir des spectres TOCSY (Braunschweiler et Ernst, 1983) et des attributions séquentielles à partir des spectres NOESY (Kumar *et al.*, 1980). Ces deux spectres ont été suffisants pour l'attribution des déplacements chimiques des protons de nos peptides (26 résidus : K26D et K26D-P ; 19 résidus : M19T).

L'attribution des déplacements chimiques est essentielle aussi bien à la prédiction de structures secondaires qu'à la modélisation moléculaire. L'identification des structures secondaires (hélice α et feuillet β) peut être déterminée à partir des déplacements chimiques, qui sont très sensibles à leur environnement (Wishart *et al.*, 1991a ; Wishart *et al.*, 1991b ; Wishart *et al.*, 1992). À partir des déplacements chimiques du peptide K26D utilisé à une concentration de 800 μ M dans du tampon PIPES deutéré à 50 mM (pH 6,4) à 20 °C, nous avons procédé à l'analyse des déviations des déplacements chimiques des protons α du peptide K26D (δ_{obs}) par rapport à des valeurs standard des protons α pour les même résidus d'acides aminés dans des structures aléatoires (δ_{rc}) [$\Delta\delta = \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{rc}}$] (Wishart *et al.*, 1995). Pour étayer ce résultat, une prédiction de structure secondaire a aussi été réalisée avec le programme HHPred (Söding, 2005).

5.4 Génération des contraintes structurales

Les contraintes structurales qui ont été déterminées dans cette étude sont de deux types : des contraintes d'angle de torsion et des contraintes de distance. Les contraintes d'angle de torsion que nous avons utilisées au cours de ce travail proviennent de l'analyse des déplacements chimiques. Les contraintes de distance dérivent des corrélations dipolaires (*NOE*) observées au cours des expériences NOESY et tr-NOESY.

Les déplacements chimiques des protons α (H_{α}) du peptide K26D ont été utilisés pour déterminer les contraintes d'angle de torsion par le programme TALOS+ (Shen *et al.*, 2009) développé à partir du programme TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999). Cette détermination s'appuie sur la recherche de similarité de déplacements chimiques secondaires des protons H_{α} de triplets d'acides aminés ($i-1$, i , $i+1$) du peptide K26D par rapport à des triplets des protéines d'une base de données (200 protéines) dont la structure tridimensionnelle et les déplacements chimiques sont connus. Lorsque les triplets comparés présentent en plus de la similarité des déplacements chimiques secondaires les mêmes types d'acides aminés, l'approche devient alors remarquablement solide. A partir de cette analyse, le programme

présente les 10 résultats les plus proches pour les déplacements chimiques secondaires du résidu central (*i*) du triplet du peptide K26D. Les angles dièdres (ϕ et ψ) des structures de ces 10 meilleurs résultats sont proposés et visualisés sur un diagramme de Ramachandran pour être validés. Si les angles dièdres se regroupent dans une même région favorable du diagramme, le résultat est dit satisfaisant et les valeurs moyennes pour ces angles dièdres (ϕ et ψ) sont alors proposées pour servir par la suite comme des contraintes d'angle dièdre.

Par ailleurs dans notre étude, les couplages dipolaires (*tr-NOE*) du peptide K26D en interaction avec la tubuline observés dans le spectre tr-NOESY ont été utilisés pour générer les contraintes de distance puisque l'intensité de chaque pic de corrélation est fonction de la distance qui sépare ces protons ainsi couplés. Les contraintes de distance du spectre tr-NOESY ont été générées grâce à l'utilisation du programme NMRView qui a mesuré l'intensité (*I*) des pics de corrélation par intégration de leur volume. Ensuite, ces intensités ont été converties en distance selon la relation $I_{ij}/I_{ref} = (r_{ref}/r_{ij})^6$ (Baleja *et al.*, 1990). La calibration de ces distances a été réalisée en utilisant la distance fixe entre les protons H $_{\delta}$ -H $_{\epsilon}$ du noyau aromatique du résidu tyrosine (Y247).

5.5 Modélisation moléculaire

Le calcul de structures a été réalisé à l'aide du logiciel CNS 1.1 (Brunger *et al.*, 1998). Ce programme utilise un protocole de recuit simulé, qui consiste à minimiser l'énergie globale du peptide tout en respectant la géométrie du squelette peptidique et en satisfaisant toutes les contraintes expérimentales, puisque cette énergie comprend aussi bien l'énergie interne qui tient compte de toutes les interactions entre atomes *non liés* et *liés* et l'énergie des contraintes expérimentales (l'énergie liée aux contraintes d'angles dièdres et des distances).

Cette modélisation moléculaire utilise les contraintes obtenues de distance et d'angle dièdre comme *des fichiers d'entrée* pour générer *des fichiers de sortie* contenant toutes les coordonnées cartésiennes de tous les atomes des résidus d'acides aminés des structures calculées du peptide K26D. Un total de 425 contraintes de distances et 24 contraintes d'angle de torsion (12 ϕ et 12 ψ) a été utilisé pour ce calcul. Ces 425 contraintes de distance (*NOE*) se répartissent entre 199 *NOE* intra-résiduels, 152 séquentiels, 69 à moyenne portée et 5 de longue portée.

Sur les 100 structures modélisées lors du calcul, les dix structures de plus basse énergie du peptide K26D lié à la tubuline ont été sélectionnées. Ces structures ont été analysées et visualisées par le logiciel MOLMOL version 2.6 (Koradi *et al.*, 1996).

En outre, le programme PROCHECK-NMR version 3.5.4 (Laskowski *et al.*, 1993) a été utilisé afin de vérifier la qualité de la géométrie du squelette peptidique du peptide K26D lié à la tubuline en reportant toutes les valeurs des angles de torsion (ϕ et ψ) des 10 structures calculées de plus basse énergie sur la carte de Ramachandran. Les résultats sont présentés sous forme de statistiques qui montrent la répartition de ces couples d'angles pour tous les résidus d'acides aminés du peptide K26D dans les différentes zones de la carte (favorable, permise, non permise ou interdite) et ceci pour toutes les structures.

Nous avons par ailleurs utilisé le programme MOLMOL afin de visualiser la structure du peptide K26D. De plus, le calcul du RMSD qui représente l'écart moyen quadratique entre les différentes structures calculées a été réalisé afin de valider la qualité de ces structures. Cet écart, qui est donné en unités angström (Å), a été mesuré sur le squelette peptidique de ces structures et sur les atomes « lourds » (C, O, N, S...).

6. Etude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules par STD-NMR

L'expérience tr-NOESY apporte des données qui sont utilisées pour la détermination de la structure tridimensionnelle d'un ligand en interaction avec son récepteur protéique. Les expériences STD-NMR (Mayer et Meyer, 1999 ; Mayer et Meyer, 2001), de leur côté fournissent des informations sur les protons du ligand qui sont en contact direct avec le récepteur protéique (dans ce cas la tubuline) et viennent ainsi en complément des données de tr-NOESY en éclairant les résidus impliqués dans le site de liaison. La proximité des protons entre la tubuline et le peptide K26D se traduit par des variations de l'intensité du signal RMN : plus le proton est proche, plus importante sera l'intensité du pic RMN (cf. **figure 3.14**) (Mayer et Meyer, 1999 ; Mayer et Meyer, 2001). De plus, l'expérience STD-NMR ne nécessite aucun marquage (Bhunja *et al.*, 2012 ; Clement *et al.*, 2010 ; Pellecchia *et al.*, 2002).

Pour cela, dans cette étude, nous avons réalisé des expériences STD-NMR pour déterminer les résidus du peptide K26D (ligand de faible masse molaire : 2,7 kDa) impliqués dans son interaction avec la tubuline (récepteur protéique de masse moléculaire d'environ 110 kDa) et les microtubules.

La tubuline est saturée sélectivement par une série de 40 impulsions de forme gaussienne de 50 ms séparées par des intervalles d'une milliseconde. Le temps total de saturation est de 2,04 s. La suppression du signal de l'eau a été réalisée par la séquence Watergate (Piotto *et al.*, 1992) avant l'acquisition des spectres. Deux spectres ^1H -RMN sont

enregistrés, l'un avec une irradiation sélective des résonances du groupe méthyle de la tubuline (irradiation à -0,5 ppm) où aucun proton du peptide ne résonne, et l'autre pour obtenir des spectres témoins de référence avec une irradiation qui est en dehors de l'intervalle de résonance du peptide et de la tubuline (irradiation à 40 ppm). Le spectre STD-NMR est le spectre de différence qui est généré à partir des deux spectres qui sont enregistrés avec irradiation sélective *on-resonance* et avec irradiation hors résonance (*off-resonance*) de la tubuline.

Des spectres RMN du proton à une dimension (1D- ^1H) et des spectres STD-NMR ont été acquis dans les mêmes conditions expérimentales pour le peptide K26D seul et en complexe avec la tubuline dans un rapport molaire de 20:1 (K26D 800 μM ; tubuline 40 μM ; tampon PIPES deutéré 50 mM, pH 6,4). Le témoin contenant le peptide seul a été réalisé pour s'assurer que l'irradiation à -0,5 ppm n'affecte pas les résonances du peptide.

L'étude de l'interaction du peptide K26D avec les microtubules a aussi été réalisée par des expériences STD-NMR en utilisant les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées dans l'étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline. La tubuline a été utilisée à 40 μM dans l'échantillon « microtubules », la seule différence est que la tubuline est sous forme de polymère, ce qui a nécessité l'utilisation d'un tampon de polymérisation (tampon PIPES deutéré 50 mM, pH 6,4 ; GTP 1 mM ; MgCl_2 4 mM ; taxol 20 μM). Il faut noter que le glycérol n'a pas été utilisé dans cette polymérisation afin d'éviter que ces protons n'interfèrent avec ceux du peptide. La polymérisation des microtubules a duré 1 h à 37 °C suivie d'une deuxième incubation de 1 h à 20 °C. Ensuite, une centrifugation a été réalisée (25 000 $\times g$; 15 min à 20 °C). Après centrifugation, le culot a été lavé plusieurs fois avec du tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 et repris dans le même tampon en respectant le volume qui a été utilisé pour la polymérisation afin de garder la même concentration en tubuline.

7. Étude de l'interaction du peptide K26D-P avec la tubuline par STD-NMR

L'étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules par les expériences STD-NMR a permis d'identifier les résidus qui sont impliqués dans cette interaction. Ces résultats ont montré que le résidu tyrosine 247 (Y247) est impliqué dans la liaison spécifique du peptide K26D à la tubuline et aux microtubules. Le résidu Y247 du domaine C-terminal de la Cx43 est connu pour être un site de phosphorylation par la protéine kinase v-Src (Lin *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2006). En s'appuyant sur ces observations, nous avons postulé que le résidu Y247 pourrait représenter un site de régulation putatif pour l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules. Pour tester cette hypothèse,

nous avons étudié par RMN en solution l'interaction du peptide K26D-P avec la tubuline (K26D-P possède la même séquence que le peptide K26D mais son résidu Y247 est phosphorylé). Les spectres des expériences STD-NMR, NOESY et tr-NOESY ont été acquis dans des conditions similaires à celles utilisées pour étudier l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules.

8. Étude de la compétition entre les peptides M19T et K26D pour leur liaison à la tubuline

Enfin, nous avons essayé d'apporter des éléments supplémentaires pour une meilleure compréhension de la compétition entre les facteurs de transcription Smad2/3 et la Cx43 pour leur liaison au système tubuline/microtubules. Nous avons examiné la possibilité d'une compétition entre le peptide K26D issu du domaine C-terminal de la Cx43 et un autre peptide qui correspond à la séquence M416-T434 du domaine *MH2* des protéines Smad2 pour leur liaison à la tubuline.

Dans un premier temps, nous avons d'abord voulu vérifier que le peptide M19T interagit avec la tubuline. Cette interaction a été sondée par des expériences STD-NMR et tr-NOESY en utilisant des conditions similaires à celles utilisées pour l'étude du peptide K26D en interaction avec la tubuline.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de caractériser la compétition entre ces deux ligands (K26D et M19T) en présence de leur récepteur protéique commun qui est la tubuline. Pour cela, nous avons réalisé des expériences STD-NMR et tr-NOESY pour le mélange de ces deux peptides (M19T et K26D) en présence de la tubuline puisque la compétition de ces ligands pour leur liaison à la tubuline devrait conduire à l'atténuation du signal du peptide K26D et/ou du peptide M19T que nous pourrions constater par l'exploration des spectres STD-NMR.

En outre, l'exploration de la tr-NOESY permettrait aussi de vérifier l'existence de *NOE* transférés entre ces ligands (K26D et M19T) appelés *NOE inter-ligands*. Les *NOE* inter-ligands permettent d'identifier les interactions entre les ligands qui peuvent se lier au même site de façon compétitive (Sanchez-Pedregal *et al.*, 2005) ou à des sites adjacents (séparés par une distance inférieure à 5Å) (Becattini et Pellecchia, 2006) au niveau de la protéine réceptrice. L'effet compétitif de ces ligands ou leur proximité conduirait à des *NOE* qui sont relayés par la protéine et transférés d'un ligand à l'autre.

Le rapport molaire utilisé est de 20:20:1 pour M19T:K26D:tubuline (M19T 800 µM ; K26D 800 µM ; tubuline 40 µM ; tampon PIPES deutéré 50 mM à pH 6,4).

Chapitre V :
Résultats
&
Interprétation

1. Le peptide K26D ne semble pas affecter la dynamique de polymérisation des microtubules

Pour compléter les investigations préliminaires de l'analyse structurale du peptide K26D avec la tubuline, nous avons évalué l'impact du peptide K26D sur la dynamique de l'assemblage des microtubules. D'après nos observations, le peptide K26D ne semble affecter ni la phase de nucléation ni la phase d'élongation lors de la polymérisation des microtubules (**figure 5.1**).

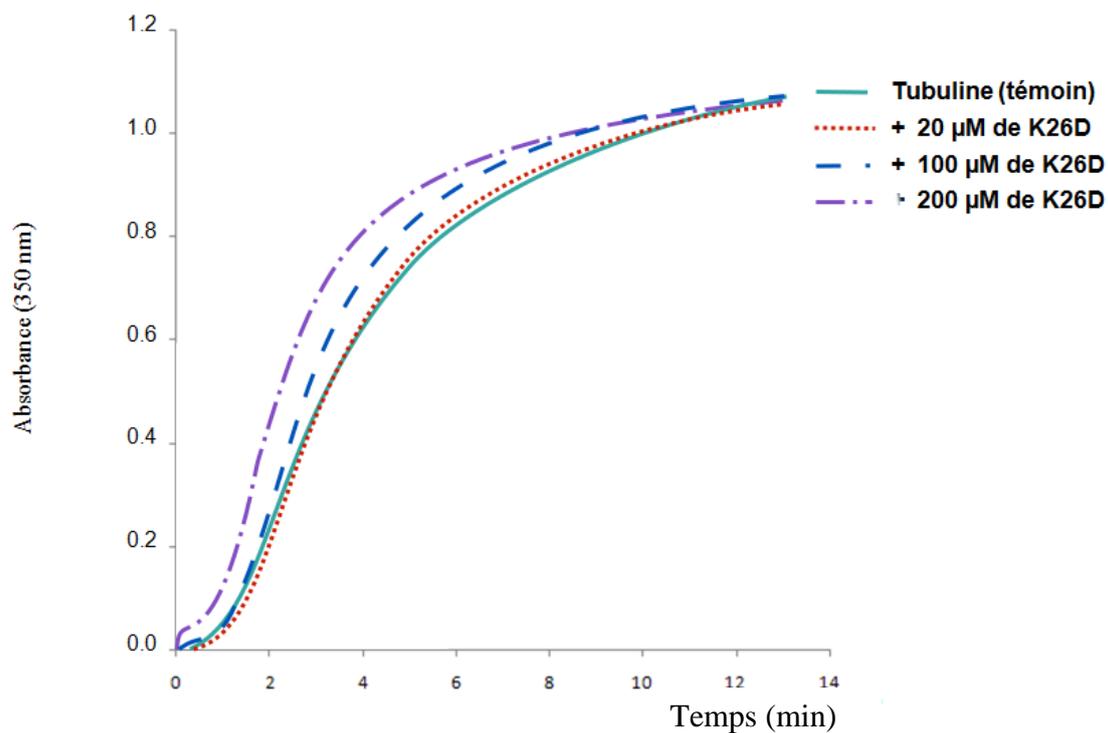


Figure 5.1 : Le peptide K26D n'affecte pas la polymérisation apparente de la tubuline. Assemblage de la tubuline suivi par turbidimétrie à 350 nm en fonction du temps en absence et en présence de différentes concentrations du peptide K26D.

2. Co-sédimentation du peptide K26D avec les microtubules.

Nous avons procédé à l'étude de l'interaction du peptide K26D avec les microtubules en utilisant des expériences de co-sédimentation et analyse des fractions microtubules et surnageants par 1D-SDS-PAGE à 12 % comme un test préliminaire (**figure 5.2**). Des microtubules ont été préparés comme décrit dans le chapitre *Matériels et méthodes*. On constate que plus de 95 % de la tubuline est retrouvée dans le culot des microtubules comparé au surnageant. L'utilisation du taxol a permis de stabiliser les microtubules, ce qui explique ce taux élevé (**figure 5.2**, pistes 1 et 2). Ensuite, 600 µM du peptide K26D ont été mélangés avec

les microtubules préparés dans les mêmes conditions. Le peptide K26D est retrouvé dans les deux fractions, culot et surnageant (**figure 5.2**, pistes 3 et 4), alors qu'il n'est retrouvé que dans la fraction surnageant dans le tube témoin en absence de partenaire (**figure 5.2**, pistes 5 et 6). Ces résultats témoignent d'une interaction probable et directe entre le peptide K26D et le système tubuline/microtubules.

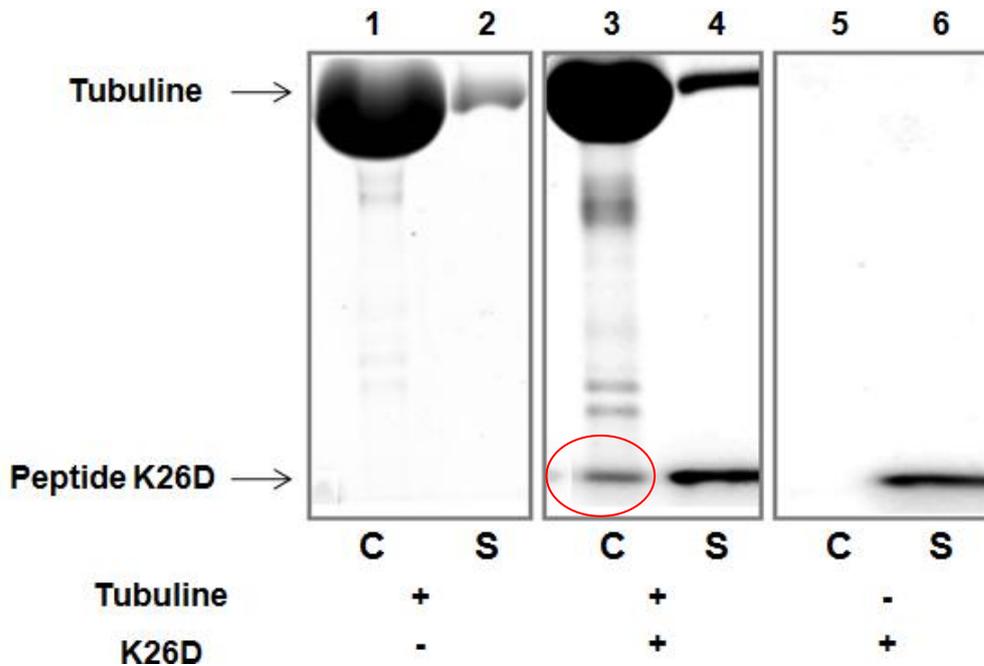


Figure 5.2 : Le peptide K26D co-sédimente avec les microtubules

3. Le peptide K26D adopte une conformation en hélice après sa liaison à la tubuline

Les expériences de co-sédimentation suggèrent ainsi une interaction directe entre le peptide K26D et le système tubuline/microtubules. Par ailleurs, la caractérisation structurale de cette interaction s'est faite à l'aide d'expériences de spectroscopie RMN. L'exploitation des données fournies par des expériences RMN 2D homonucléaires (TOCSY et NOESY) que nous avons réalisées pour le peptide K26D seul a permis l'attribution complète des déplacements chimiques de ses protons (^1H) (**tableau 5.1**).

Tableau 5.1 : Attributions des déplacements chimiques des protons du peptide K26D

Résidus	H _N	H _α	H _β	Autres		
K ²³⁴	ND					
G ²³⁵	ND					
V ²³⁶	8,37	4,07	2,08	H_γ 0,93		
K ²³⁷	8,54	4,277	1,81- 1,74	H_γ 1,43 -1,40	H_δ 1,65	H_ε 2,97
D ²³⁸	8,242	4,534	2,66- 2,58			
R ²³⁹	8,32	4,29	1,82-1,75	H_γ 1,59- 1,63	H_δ 3,17	H_ε 7,25
V ²⁴⁰	8,297	4,033	2, 037	H_γ 0,926		
K ²⁴¹	8,55	4,267	1,81- 1,76	H_γ 1,43-1,40	H_δ 1,66	H_ε 2,97
G ²⁴²	8,54	3,92-3,97				
K ²⁴³	8,30	4,34	1,82-1,74	H_γ 1,41	H_δ 1,64	H_ε 2,97
S ²⁴⁴	8,49	4,43	3,81-3,81			
D ²⁴⁵	8,49	4,43	2,56-2,76			
P ²⁴⁶	-	4,34	1,92-2,16	H_γ 1,61-1,73	H_δ 3,81 -3,71	
Y ²⁴⁷	8,30	4,44	2,93		H_δ 7,07	H_ε 6,78
H ²⁴⁸	7,96	4,55	3,18-3,04		H_{δ2} 7,22	H_{ε1} 8,45
A ²⁴⁹	8,39	4,30	1,38			
T ²⁵⁰	8,33	4,37	4,26	H_γ 1,20		
S ²⁵¹	8,41	4,46	3,90 3,85			
G ²⁵²	8,52	3,94				
A ²⁵³	8,19	4,28	1,35			
L ²⁵⁴	8,36	4,36	1,62	H_γ 1,55	H_δ 0,85-0,90	
S ²⁵⁵	8,36	4,72	3,78-3,84			
P ²⁵⁶	-	4,40	2,27	H_γ 1,98-1,90	H_δ 3,78-3,69	
A ²⁵⁷	8,45	4,26	1,37			
K ²⁵⁸	8,42	4,32	1,84-1,72	H_γ 1,42	H_δ 1,65	H_ε 2,98
D ²⁵⁹	8,03	4,35	2,64 2,54			

ND : non déterminé. K26D 800 μM, tampon PIPES deutéré 50 mM (pH 6,4) à 9 °C.

Nous avons analysé les déplacements chimiques des protons α du peptide K26D (seul) pour rechercher la présence éventuelle d'hélice α ou de feuillet β dans la structure de ce peptide. Pour cela, les déplacements chimiques secondaires des H_α ($\Delta\delta H_\alpha$) du peptide K26D (ppm) sont rapportés pour chaque résidu du peptide. Les résidus D245, P246, Y247 et H248 présentent des déviations négatives (inférieures à -0,1 ppm) par rapport à leurs valeurs standard en *random coil*, ce qui suggère que cette séquence a une tendance à former une structure α -hélicoïdale (**figure 5.3**). Cette tendance a été par ailleurs illustrée par le programme de prédiction de structure secondaire HHPred (Söding, 2005) qui montre que le peptide K26D est prédit principalement non structuré, avec néanmoins une tendance hélicoïdale pour la séquence P246- L254.

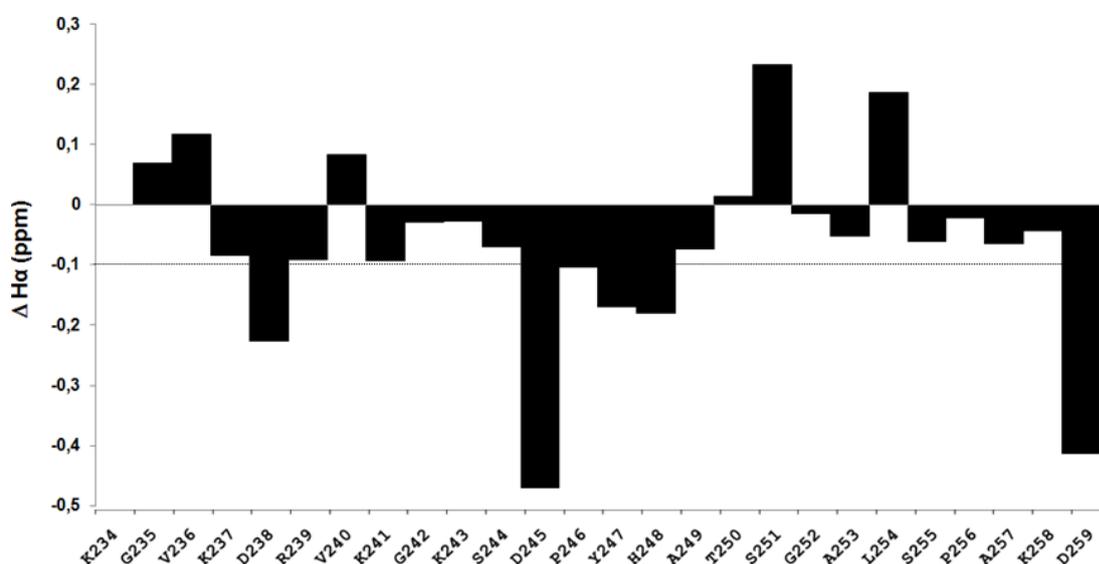


Figure 5.3 : La prédiction de la structure secondaire du peptide K26D montre une tendance à former une hélice

Déviations des déplacements chimiques des H_α de leur valeur standard (*random coil*) du peptide K26D à 800 μM dans le tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 20 °C.

Les contraintes expérimentales d'angle dièdre ont été générées à partir des déplacements chimiques attribués. Un total de 24 contraintes d'angle de torsion ont été prédites à partir des déplacements chimiques observés des protons α (H_α) avec un bon score (angles de torsion regroupés dans la même région de la carte pour au moins 9 résultats sur 10) par le logiciel TALOS+ (Shen *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'attribution complète de tous les protons du peptide K26D est aussi nécessaire à l'attribution du spectre de la *tr*-NOESY du peptide K26D en présence de tubuline qui présente des couplages dipolaires du ligand (K26D) lié à son récepteur protéique (tubuline). Ces *NOE* sont appelés *NOE transférés* (*tr-NOE*).

L'exploration du spectre de la *tr*-NOESY a permis de confirmer l'interaction du peptide K26D avec la tubuline puisque la comparaison du spectre NOESY du peptide K26D seul (**figure 5.4A**) et du spectre *tr*-NOESY du peptide K26D enregistré en présence de tubuline (**figure 5.4B**) montre un renforcement significatif de certains pics de corrélation dipolaire ainsi que l'apparition de nouveaux pics dans le spectre de la *tr*-NOESY. Ce renforcement de *NOE* et ces *NOE* supplémentaires du peptide K26D en présence de la tubuline correspondent aux *tr*-*NOE*.

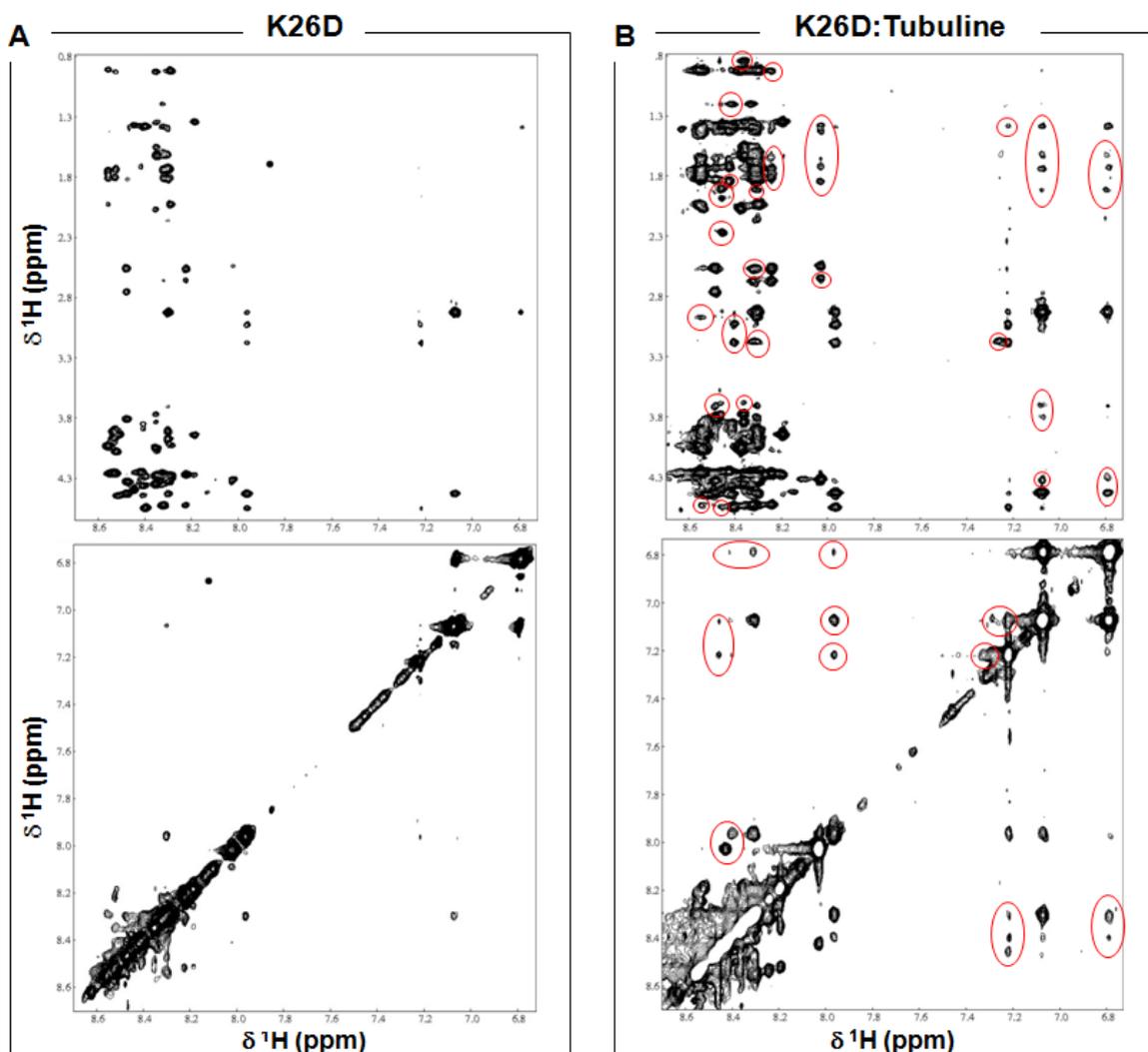


Figure 5.4 : Les *tr*-*NOE* témoignent d'un repliement du peptide K26D lors de son interaction avec la tubuline

A) Régions des pics de corrélation des protons amides/aromatiques -protons aliphatiques (en haut) et des protons amides/aromatiques (en bas) du spectre NOESY du peptide K26D à 800 μ M.

B) Spectre *tr*-NOESY des mêmes régions, en présence de 40 μ M de tubuline.

Les spectres ont été acquis à 9 °C avec un temps de mélange de 200 ms dans un tampon PIPES deutéré 50 mM à pH 6,4.

La spécificité de la liaison du peptide K26D à la tubuline a été démontrée par l'absence de *NOE* transférés lorsque l'albumine sérique bovine a été utilisée comme récepteur protéique à la place de la tubuline, et ceci dans les mêmes conditions expérimentales (**figure 5.5**).

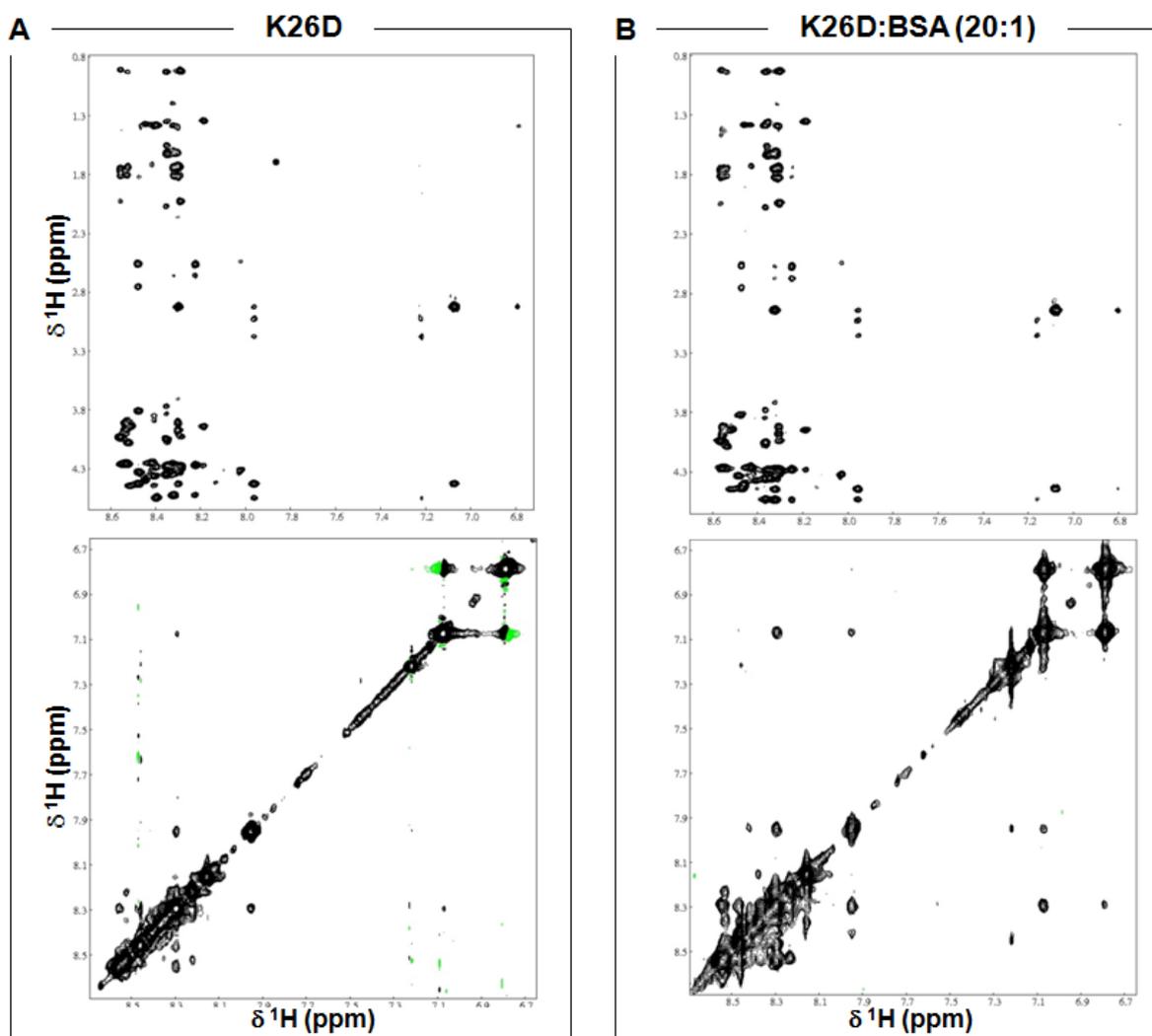


Figure 5.5 : La tr-NOESY ne montre pas de structuration du peptide K26D en présence de BSA

A) Régions des pics de corrélation des protons amides/aromatiques -protons aliphatiques (en haut) et des protons amides/aromatiques (en bas) du spectre NOESY du peptide K26D à 800 μM .

B) Les mêmes régions du spectre tr-NOESY en présence de BSA à 40 μM .

Les spectres ont été acquis à 9 °C dans le tampon PIPES deutéré 50 mM à pH 6,4 et avec un temps de mélange de 200 ms.

Par ailleurs, la *tr*-NOESY a aussi servi à la détermination de la conformation du peptide K26D en interaction avec la tubuline puisqu'elle permet de fournir les données expérimentales (interactions dipolaires entre les protons) qui seront utilisées sous forme de contraintes de distance par les programmes de modélisation moléculaire. Les *tr*-NOE du peptide K26D observés en présence de la tubuline contiennent en effet des informations sur l'organisation structurale du peptide lié à la tubuline.

Parmi les NOE supplémentaires observés sur la *tr*-NOESY en présence de la tubuline, nous avons retrouvé des NOE intra-résidus, des NOE séquentiels ($i, i+1$) et de façon intéressante les NOE à moyenne portée [$(i, i+2), (i, i+3), (i, i+4)$] et à longue portée ($i, i+n$; $n>4$) qui sont importants pour la stabilité des conformations locale et globale du peptide, parmi lesquels les NOE : $H^{248}(H_\epsilon)$ - $V^{240}(H_\gamma)$; $Y^{247}(H_\delta)$ - $V^{240}(H_\gamma)$; $Y^{247}(H_\epsilon)$ - $R^{239}(H_\beta)$; $A^{253}(H_N)$ - $S^{251}(H_\omega)$.

Un total de 425 NOE qui impliquent 199 NOE intra-résidus, 152 séquentiels, 69 à moyenne portée et 5 de longue portée ont servi par la suite à la génération des contraintes de distance. Les intensités de ces pics de corrélation ont été converties en contraintes de distance par le programme NMRVIEW.

Ces contraintes de distance ainsi que les contraintes d'angles de torsion ont été utilisées comme contraintes expérimentales pour le calcul de structure du peptide K26D en interaction avec la tubuline par le programme de modélisation CNS. Sur 100 structures calculées, les 10 conformations de plus basse énergie ont été choisies pour la réalisation des statistiques de structure qui sont regroupées dans le **tableau 5.2** (présenté ci-après). La structure moyenne du peptide K26D générée par le programme MOLMOL est représentée dans la **figure 5.6**. Elle correspond à la moyenne des 10 structures de plus basse énergie. Cette structure a été déposée dans la banque de données PDB²³ sous le code 2LL2.

Cette structure montre que le peptide K26D adopte une structure hélicoïdale compacte lors de son interaction avec la tubuline. Elle présente trois régions hélicoïdales, une hélice α centrale et deux hélices 3_{10} qui se trouvent de part et d'autre de l'hélice α .

L'hélice α centrale du peptide K26D s'étend sur sept résidus, ²⁴⁶PYHATSG²⁵². L'hélice 3_{10} qui se trouve à l'extrémité N-terminale de l'hélice α s'étend sur les résidus ²⁴⁰VKG²⁴² alors que celle de l'extrémité C-terminale s'étend sur les résidus ²⁵⁵SPA²⁵⁷.

²³ PDB (Protein Data Bank) : banque de données sur les protéines du Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. <http://www.rcsb.org>

La structure de l'hélice α centrale est stabilisée par des liaisons hydrogène caractéristiques des hélices α de type ($i \rightarrow i+4$) entre l'oxygène du carbonyle (CO) du résidu Y247 (i) et l'hydrogène de l'amide (NH) du résidu S251 ($i+4$). Les hélices 3_{10} sont aussi stabilisées par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre les résidus ($i \rightarrow i+3$). Les liaisons hydrogène qui stabilisent les hélices 3_{10} des extrémités N-terminale et C-terminale relient les résidus V240 \rightarrow K243 et L254 \rightarrow A257, respectivement. Cette structure présente aussi un coude β situé entre le résidu G252 (i) et le résidu S255 ($i+3$) et qui permet ainsi de relier l'hélice α centrale et l'hélice 3_{10} du côté C-terminal. Ce coude a été classé comme coude β de type I sur la base à la fois des valeurs caractéristiques des angles dièdres ($\phi_{i+1} = -57,51 \pm 0,31^\circ$, $\psi_{i+1} = -24,88 \pm 0,89^\circ$, $\phi_{i+2} = -99,60 \pm 1,79^\circ$, $\psi_{i+2} = 7,74 \pm 0,5^\circ$) et de la présence de la liaison hydrogène entre l'oxygène du CO du résidu G252 (i) et l'hydrogène du NH du résidu S255 ($i+3$).

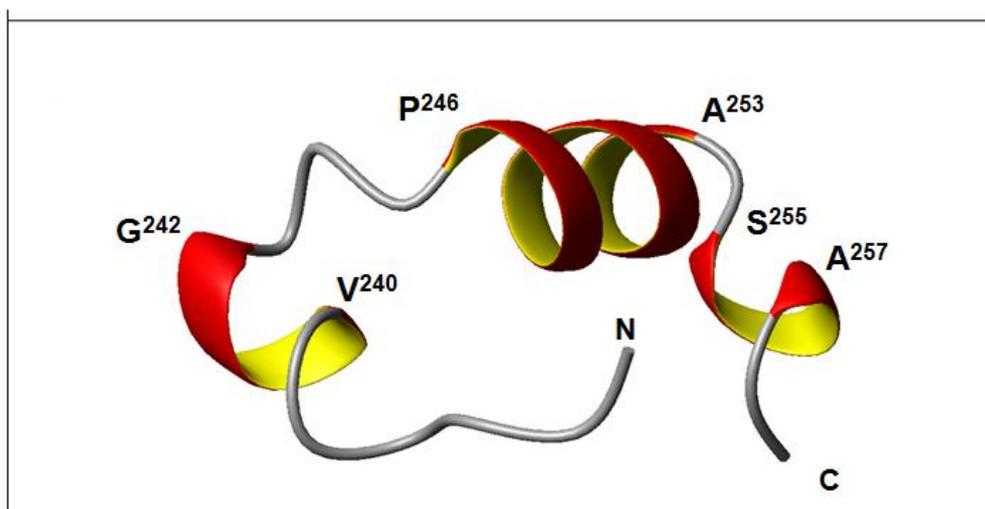


Figure 5.6 : La structure moyenne du peptide K26D montre trois régions hélicoïdales. Cette représentation en ruban du peptide K26D a été générée par le logiciel MOLMOL.

Nous avons par ailleurs procédé à l'analyse de ces structures en calculant le RMSD. Sur les 100 structures calculées du peptide K26D, les dix structures de plus basse énergie ont été superposées par le programme MOLMOL. Les structures obtenues sont bien définies du résidu V240 au résidu A257, avec une valeur très faible du RMSD de 0,21Å pour le squelette peptidique. Les régions N- et C-terminales sont moins bien structurées (**figure 5.7**).

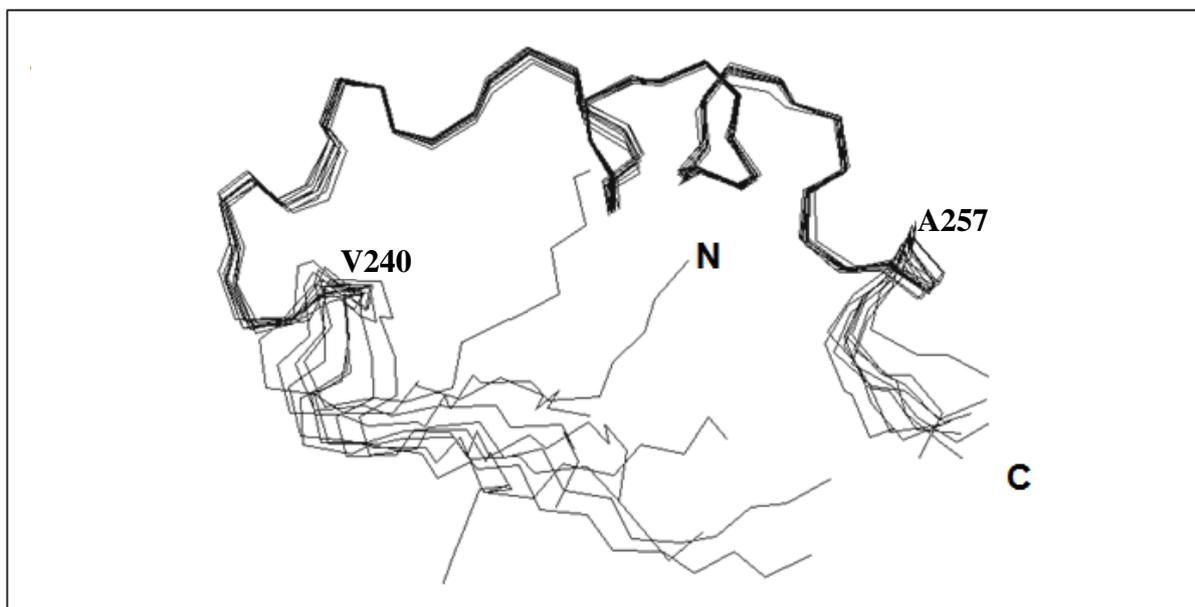


Figure 5.7 : La structure du peptide K26D est bien définie du résidu V240 au résidu A257

La superposition du squelette des 10 structures de plus basse énergie du peptide K26D a été réalisée du résidu V240 au résidu A257 par le programme MOLMOL (RMSD de 0,21 Å).

Nous avons procédé également à l'analyse de la validité de ces structures par l'utilisation du programme PROCHECK-NMR qui permet de vérifier la qualité de la géométrie des structures. Les valeurs des angles de torsion (ϕ et ψ) des 10 structures calculées du peptide K26D de plus basse énergie sont reportées sur la carte de Ramachandran. Ces valeurs d'angles de torsion sont réparties ainsi dans les différentes régions de la carte (favorables, permises, non permises ou interdites) et sont ainsi comptabilisées. Cette carte montre que la très grande majorité des résidus du peptide K26D (86,4 %) présente des couples d'angles de torsion ϕ et ψ du squelette peptidique du peptide K26D qui sont situés dans les régions favorables et permises du diagramme de Ramachandran. Les deux résidus (VAL3 et ASP5) qui se trouvent dans la région non permise, pour une seule structure calculée, correspondent aux résidus V236 et D238 du peptide K26D. Ces deux résidus se trouvent dans une région non structurée (extrémité N-terminale du peptide) (**figure 5.8**).

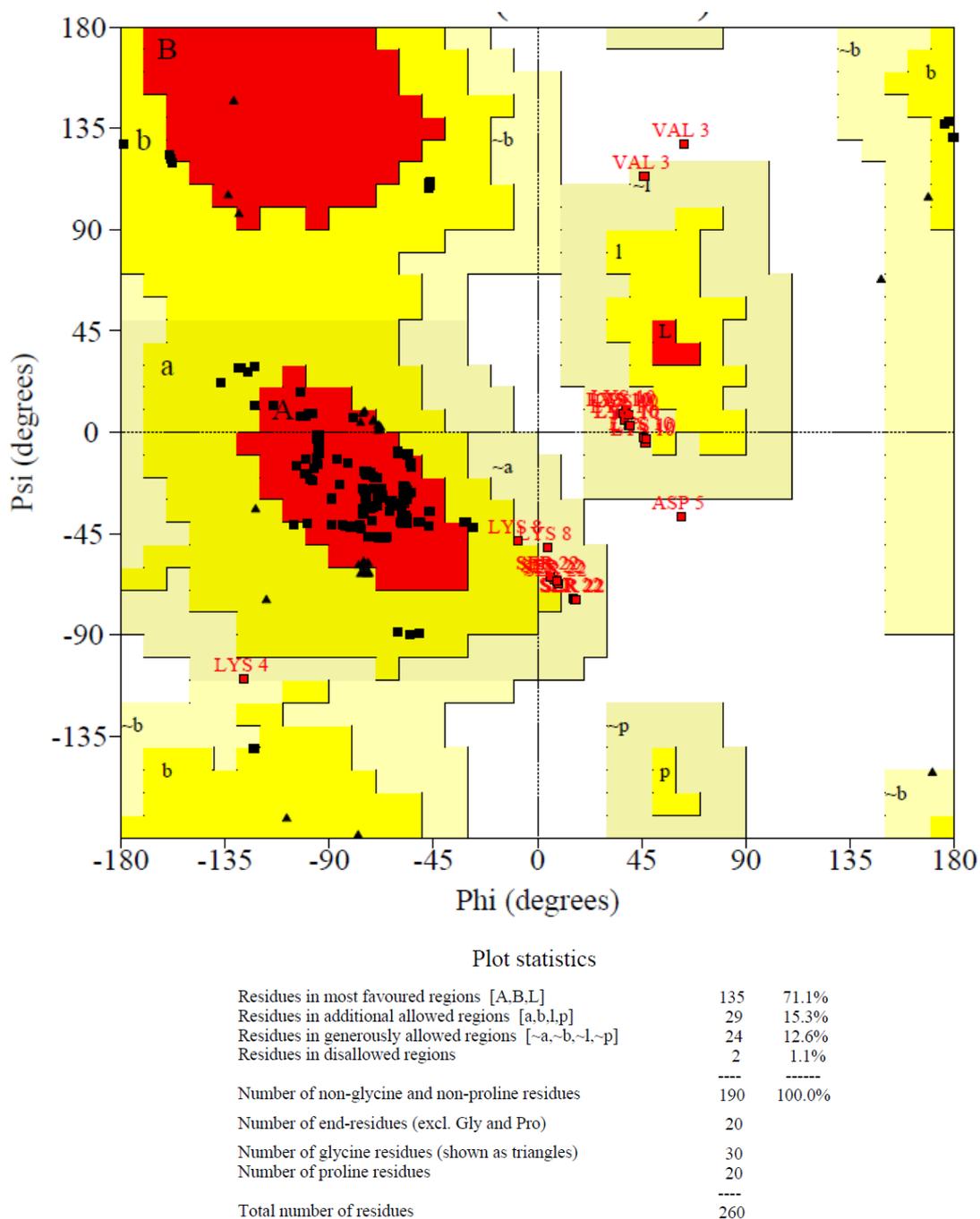


Figure 5.8 : Distribution des angles phi et psi des 10 meilleures structures du peptide K26D dans le diagramme de Ramachandran

Les valeurs des angles de torsion (phi, psi) des 10 structures calculées du peptide K26D de plus basse énergie sont reportées sur la carte de Ramachandran et les résidus sont comptabilisés en fonction de leur répartition dans cette carte par le logiciel PROCHECK-NMR.

Les statistiques structurales des dix structures de plus basse énergie du peptide K26D ont été regroupées dans le **tableau 5.2**. En plus des données qui ont confirmé la validité des structures calculées (RMSD et statistiques de PROCHECK-NMR), ces structures montrent aussi peu de violations de contraintes structurales, aucune violation *NOE* supérieure à 0,56 Å et aucune violation d'angle de torsion supérieure à 8,28° (**tableau 5.2**).

Tableau 5.2 : Statistique structurale des 10 structures de plus basse énergie du peptide K26D lié à la tubuline

Nombre de contraintes RMN	
Contraintes de distance totales	425
Intra-résiduelles	199
Séquentielles ($ i - j = 1$)	152
A moyenne portée ($ i - j \leq 4$)	69
A longue portée ($ i - j > 4$)	5
Statistiques de structure	
Statistiques de violation	
Nombre de violations /structure	
<i>NOE</i> > 0,5 Å	0,60 ± 0,69
Violations de contraintes dièdres > 5°	2,60 ± 1,07
Violation maximale <i>NOE</i>	0,56 Å
Angle de torsion	8,28°
RMSD à partir de la géométrie idéale	
Longueurs de liaison (Å) 0,0119 ± 0,0003	
Angles de liaison (°)	1,14 ± 0,03
Impropres (°)	0,82 ± 0,02
Statistiques PROCHECK-NMR	
Résidus dans les régions les plus favorables	71,1 %
Résidus dans les régions permises	15,3 %
Résidus dans les régions généreusement permises	12,6 %
Résidus dans les régions non permises	1,1 %
RMSD moyen (Å)	
Squelette (240-257)	0,21
Atomes lourds (240-257)	0,59

4. La tyrosine 247 est impliquée dans l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules

L'identification des sites impliqués dans l'interaction du peptide K26D avec la tubuline a été réalisée en utilisant des expériences de STD-NMR. Le spectre STD-NMR a permis de montrer qu'une série de résidus chargés (R239, H248) et hydrophobes (V240, Y247 et A249) ainsi que le résidu T250 du peptide K26D sont en interaction avec la tubuline. Le spectre STD-NMR montre aussi la proximité d'au moins un proton delta (H^δ) de résidu lysine. Cependant, nous n'avons pas pu identifier lequel des cinq résidus lysines (K234, K237, K241, K243 et K258) du peptide K26D est impliqué dans cette interaction, par manque de données pour le résidu N-terminal (K234) et en raison du rapprochement des déplacements chimiques pour les autres lysines (cf. **tableau 5.1**) (**figure 5.9**). Il est intéressant de noter que le résidu Y247 est un site de phosphorylation par la protéine kinase ν -Src dans la Cx43 (Lin *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2006).

Ainsi, au moins deux régions différentes du peptide semblent donc être nécessaires pour cette liaison : une première région dans la partie N-terminale du peptide K26D et correspondant à la séquence $^{239}\text{RV}^{240}$ et une seconde région qui se trouve dans la partie centrale du peptide et qui correspond à la séquence $^{247}\text{YHAT}^{250}$.

Nous avons ensuite examiné l'interaction du peptide K26D avec les microtubules à l'aide des mêmes expériences. Des expériences STD-NMR ont été réalisées en présence des microtubules. Fait intéressant, les mêmes protons y compris le résidu Y247 ont été retrouvés sur le spectre de la STD-NMR lorsque les microtubules ont été utilisés à la place de la tubuline (**figure 5.10**).

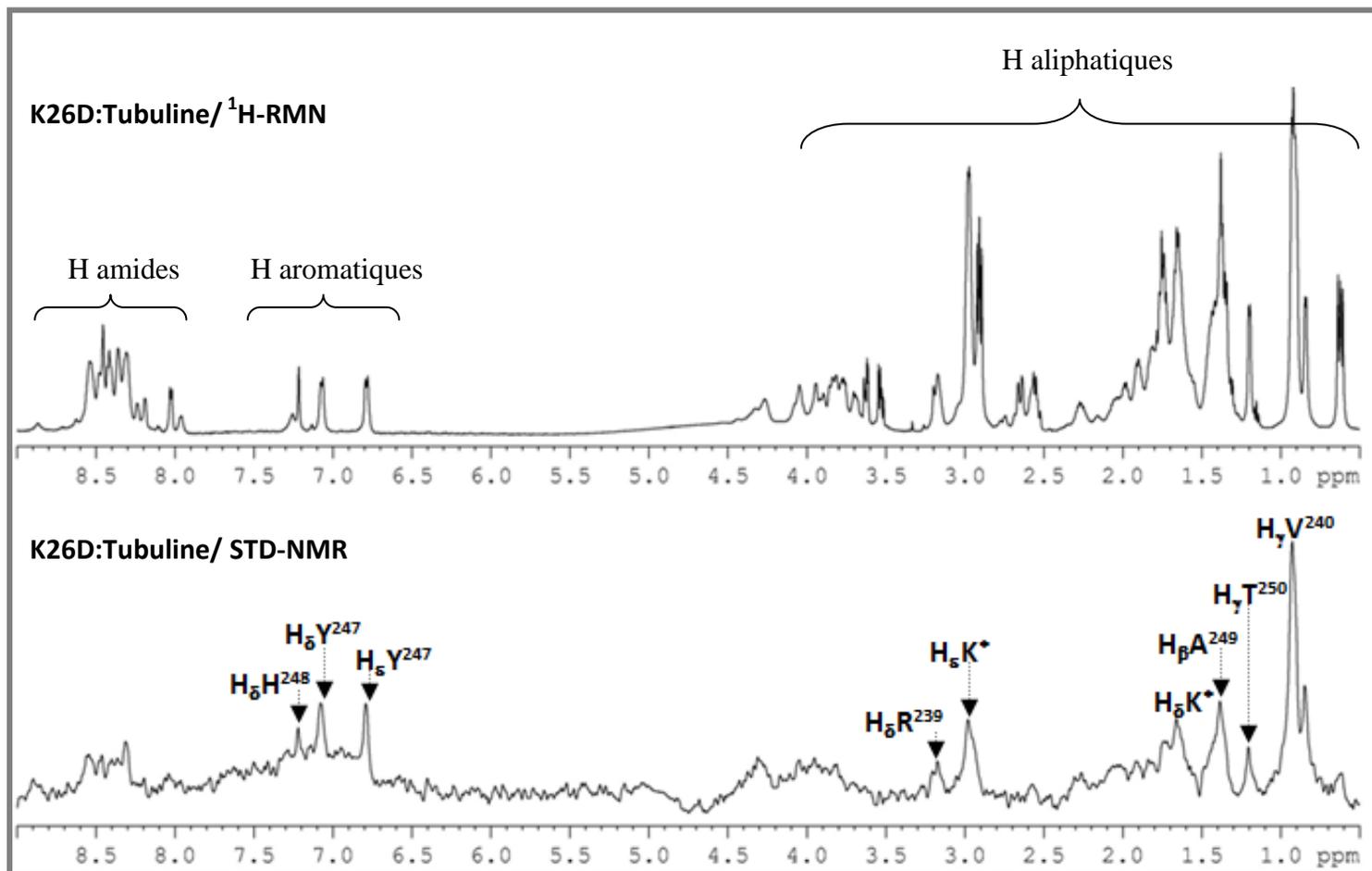


Figure 5.9 : L'interaction du peptide K26D avec la tubuline implique des résidus polaires, chargés et apolaires, y compris le résidu Y247

Spectre RMN 1D du proton et spectre STD-NMR correspondant enregistrés pour le peptide K26D à 800 μM en présence de 40 μM de tubuline. Les protons aliphatiques, aromatiques et amides sont indiqués sur le spectre 1D. Les protons des résidus du peptide K26D impliqués dans l'interaction avec la tubuline sont indiqués sur le spectre STD-NMR.

Les spectres ont été acquis dans le tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 °C. Pour les spectres STD-NMR, la tubuline a été sélectivement saturée par l'application d'une irradiation à -0,5 ppm. * : Attribution ambiguë.

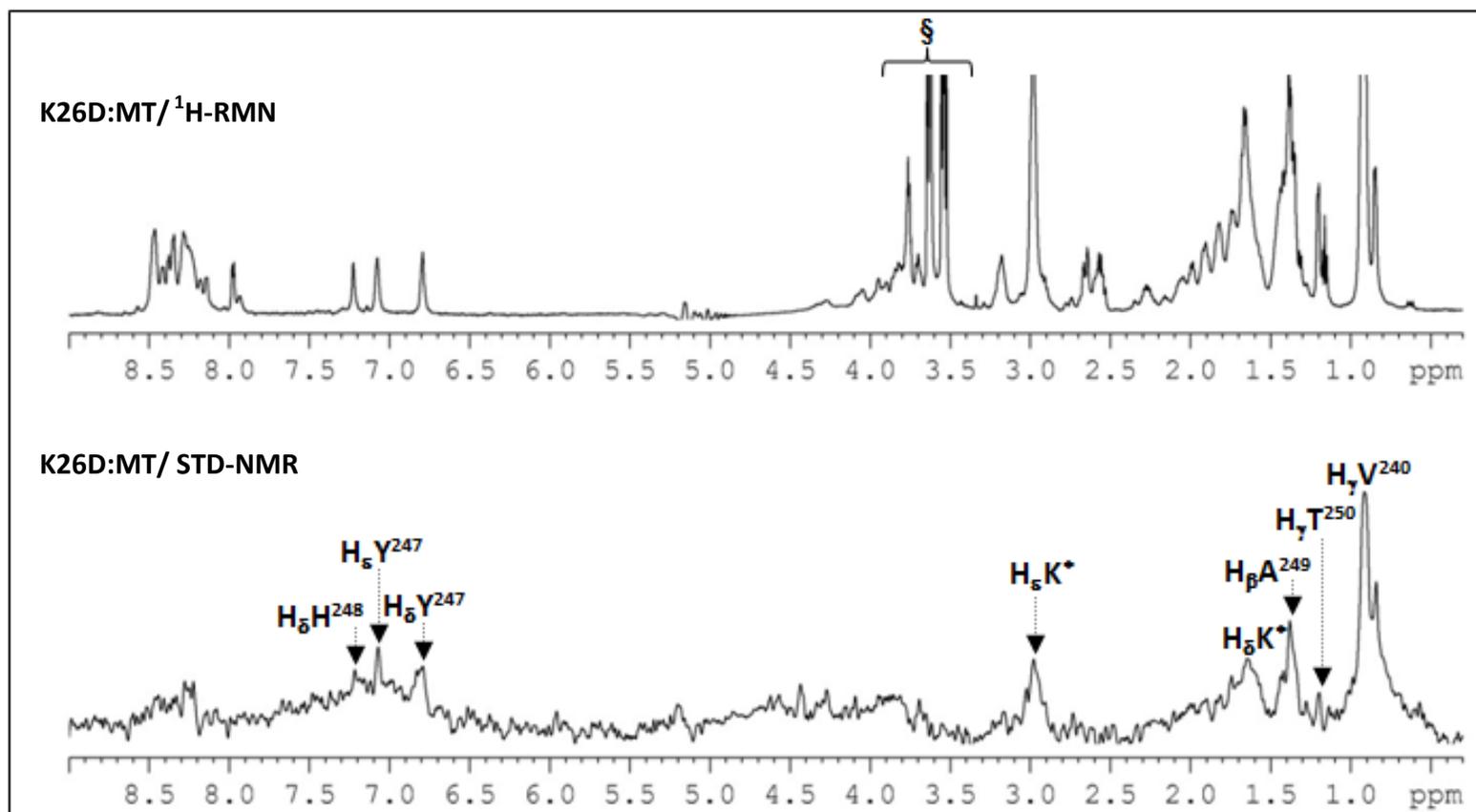


Figure 5.10 : L'interaction du peptide K26D avec les microtubules est globalement identique à celle en présence de la tubuline

Spectre RMN 1D du proton et spectre STD-NMR correspondant enregistrés pour le peptide K26D à 800 μ M en présence de microtubules assemblés à partir de 40 μ M de tubuline stabilisée par taxol.

Les protons des résidus du peptide K26D impliqués dans l'interaction avec les microtubules sont indiqués sur le spectre STD-NMR.

Les spectres ont été acquis dans le tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 20 °C. Pour les spectres STD-NMR, les microtubules ont été sélectivement saturés par l'application d'une irradiation à -0,5 ppm. * : Attributions ambiguës, § : déplacement chimique des protons du tampon MES.

La spécificité des interactions observées du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules a été validée en procédant aux mêmes expériences en présence de BSA. Les résultats montrent l'absence significative du transfert de magnétisation lorsque la BSA a été substituée à la tubuline, comme le montre le spectre STD-NMR ci-dessous (**figure 5.11**).

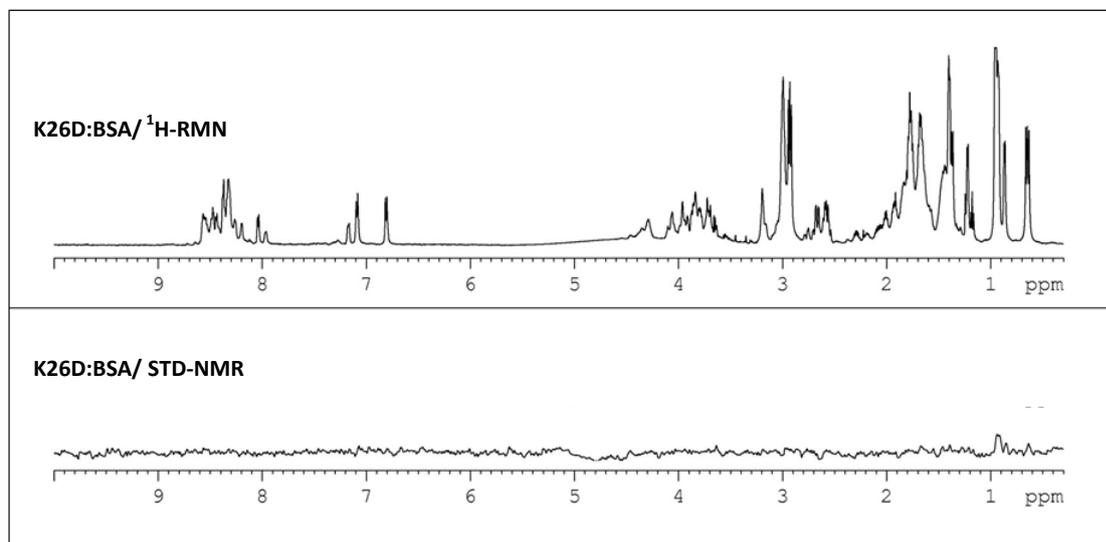


Figure 5.11 : Le peptide K26D n'interagit pas avec la BSA

Spectre proton 1D et spectre STD-NMR correspondant enregistrés pour le peptide K26D à 800 μM en présence de 40 μM de BSA. Les spectres ont été acquis dans le tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 $^{\circ}\text{C}$. Pour le spectre STD-NMR, la BSA a été saturée par l'application d'une irradiation sélective à -0,5 ppm.

Par ailleurs, le résultat de l'expérience STD-NMR du peptide K26D seul a confirmé que l'irradiation à -0,5 ppm n'affecte pas les résonances du peptide, comme le montre le spectre STD-NMR ci-dessous (**figure 5.12**).

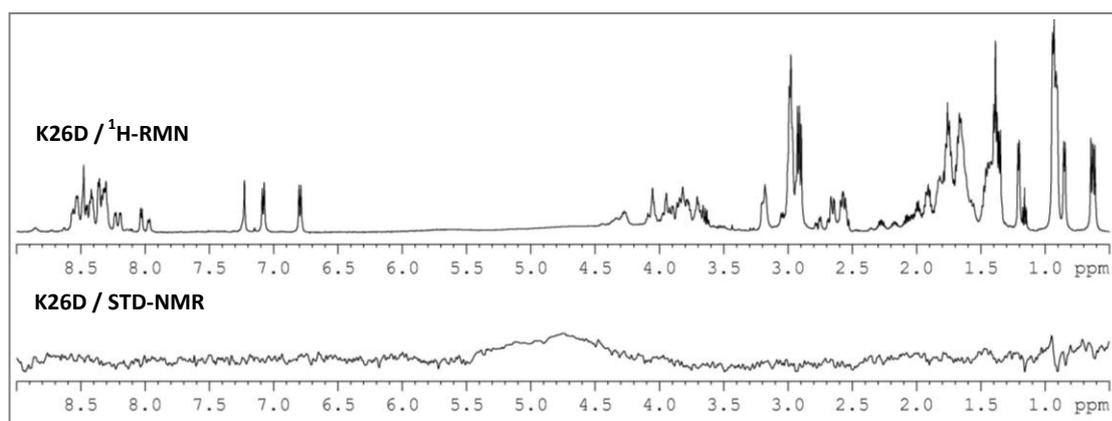


Figure 5.12 : Aucun proton du peptide K26D n'est affecté par l'irradiation à -0,5 ppm.

Spectre proton 1D et spectre STD-NMR correspondant enregistrés pour le peptide K26D à 800 μM . Les spectres ont été acquis dans le tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 $^{\circ}\text{C}$. Pour le spectre STD-NMR, une irradiation à -0,5 ppm a été appliquée.

L'étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules par l'expérience STD-NMR a montré qu'au moins deux régions R239-V240 et Y247-T250 sont nécessaires pour ces liaisons. La combinaison des données de la STD-NMR et des différentes données structurales obtenues pour le peptide K26D en interaction avec la tubuline montre que ces deux régions correspondent aux deux premières hélices observées dans la structure du peptide K26D lié. Il est aussi intéressant de noter qu'en dépit du fait que les résidus de ces deux hélices sont éloignés dans la séquence primaire du peptide K26D, leurs chaînes latérales sont spatialement proches dans la structure du peptide K26D lié à la tubuline (**figure 5.13**).

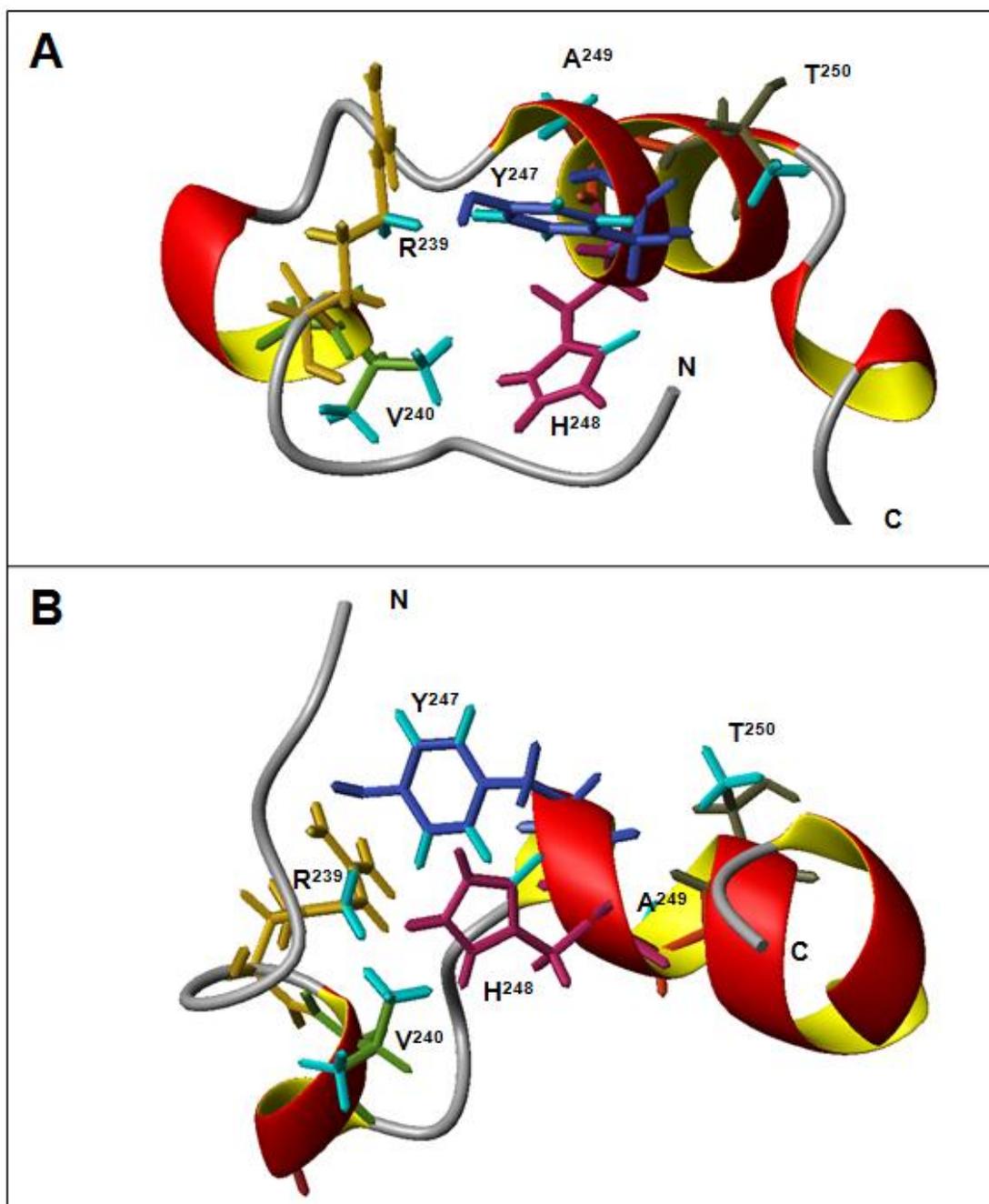


Figure 5.13 : Le repliement du peptide K26D lors de son interaction avec la tubuline rapproche les résidus en contact avec ce partenaire

A) et B) Vues de la structure moyenne du peptide K26D dans sa conformation liée à la tubuline montrant, en cyan, les protons des résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction avec la tubuline selon les résultats de la STD-NMR. Ces figures ont été générées avec le logiciel MOLMOL.

5. La phosphorylation du peptide K26D sur le résidu Y247 inhibe sa liaison à la tubuline

Les résultats des expériences STD-NMR ont indiqué que le résidu Y247 du peptide K26D est impliqué dans sa liaison spécifique à la tubuline. Le résidu Y247 est connu pour être un site de phosphorylation par la protéine kinase v-Src dans la Cx43 (Lin *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2006). En s'appuyant sur ces observations, nous avons postulé que le résidu Y247 pourrait réguler l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules. Pour cela nous avons examiné l'interaction du peptide phosphorylé K26D-P sur le résidu Y247 avec la tubuline.

Dans des conditions similaires à celles utilisées pour l'étude du peptide K26D avec la tubuline, des spectres STD-NMR et tr-NOESY ont été acquis pour le peptide K26D-P en présence de tubuline.

Nous avons réalisé aussi des expériences TOCSY et NOESY pour le peptide K26D-P seul. Ces expériences ont permis l'attribution complète des déplacements chimiques de ses protons (^1H) (**tableau 5.3**).

Tableau 5.3 : Attributions des déplacements chimiques des protons du peptide K26D-P

Résidus	H _N	H _α	H _β	Autres		
K ²³⁴	ND					
G ²³⁵	ND					
V ²³⁶	8,37	4,07	2, 07	H_γ 0,93		
K ²³⁷	8,54	4,28	1,81- 1,74	H_γ 1,40	H_δ 1,66	H_ε 2,97
D ²³⁸	8,24	4,53	2,67- 2,57			
R ²³⁹	8,32	4,29	1,82-1,75	H_γ 1,59- 1,62	H_δ 3,17	H_ε 7,27
V ²⁴⁰	8,31	4,04	2, 04	H_γ 0,92		
K ²⁴¹	8,56	4,27	1,81- 1,75	H_γ 1,45-1,40	H_δ 1,66	H_ε 2,96
G ²⁴²	8,54	3,95				
K ²⁴³	8,31	4,33	1,83-1,74	H_γ 1,44-1,41	H_δ 1,66	H_ε 2,97
S ²⁴⁴	8,49	4,40	3,83			
D ²⁴⁵	8,41	4,47	2,55-2,76			
P ²⁴⁶	-	4,36	2,20	H_γ 1,84-1,73	H_δ 3,82-3,72	
pY ²⁴⁷	8,40	4,48	2,97		H_δ 7,12	H_ε 7,09
H ²⁴⁸	8,13	4,52	3,18-3,04		H_{δ2} 7,03	H_{ε1} 8,51
A ²⁴⁹	8,38	4,33	1,40			
T ²⁵⁰	8,47	4,36	4,26	H_γ 1,21		
S ²⁵¹	8,45	4,45	3,86-3,89			
G ²⁵²	8,52	3,94				
A ²⁵³	8,19	4,28	1,35			
L ²⁵⁴	8,36	4,36	1,62	H_γ 1,55	H_δ 0,85-0,91	
S ²⁵⁵	8,36	4,72	3,78-3,84			
P ²⁵⁶	-	4,42	2,27	H_γ 2,00-1,90	H_δ 3,79-3,70	
A ²⁵⁷	8,46	4,27	1,38			
K ²⁵⁸	8,42	4,32	1,84-1,73	H_γ 1,42	H_δ 1,66	H_ε 2,98
D ²⁵⁹	8,03	4,35	2,64-2,54			

ND : non déterminé. K26D-P 800 μM, tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 °C.

Les résultats des expériences STD-NMR du peptide K26D-P en présence de la tubuline montrent que ce peptide n'interagit pas avec la tubuline, comme en témoigne l'absence de résonance des protons du peptide K26D-P sur le spectre STD-NMR. Ceci suggère que le peptide K26D perd sa capacité à interagir avec la tubuline après la phosphorylation du résidu Y247 (**figure 5.14**).

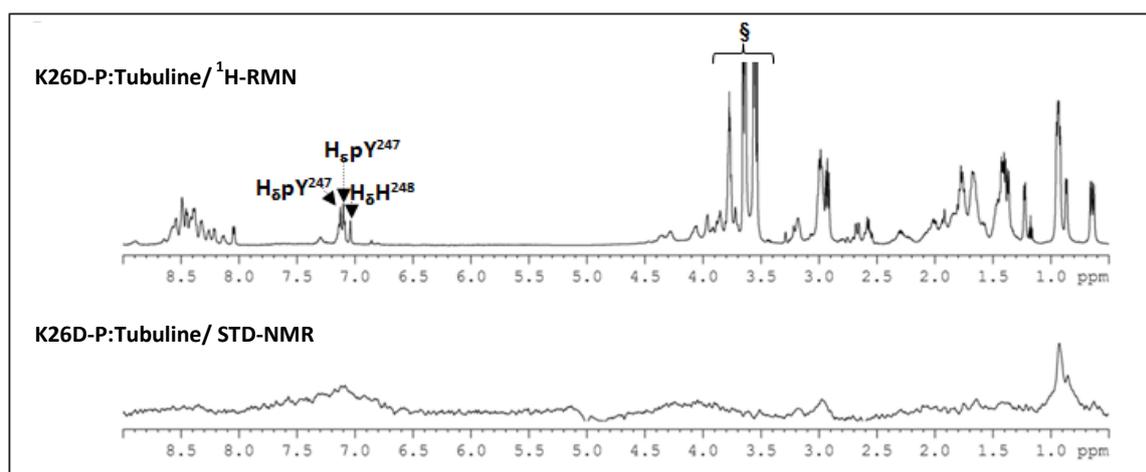


Figure 5.14 : La phosphorylation du résidu Y247 empêche l'interaction du peptide K26D avec la tubuline

Spectre RMN 1D du proton et spectre STD-NMR correspondant pour le peptide K26D-P à 800 μ M en présence de 40 μ M de tubuline.

Les protons aromatiques du résidu Y247 et le proton H_δ du résidu H248 sont indiqués sur le spectre 1D du proton (¹H-RMN).

§ : Déplacement chimique des protons du tampon MES.

Par ailleurs, l'exploration du spectre tr-NOESY du peptide K26D-P en présence de tubuline ne montre que très peu de couplages dipolaires comparé au spectre tr-NOESY du peptide K26D en présence de la tubuline. Nous avons choisi d'agrandir une région des pics de corrélation *NOE* séquentiels et à moyenne portée impliquant les résidus P246, Y247, H248 et A249 de ces deux spectres qui témoignent de cette différence (**figure 5.15**).

Ces données suggèrent que le peptide K26D-P n'est pas structuré en présence de tubuline puisque les principaux *NOE* liés au repliement du peptide K26D induit par la tubuline sont absents.

Les données fournies par les expériences STD-NMR et tr-NOESY soulignent que le résidu Y247 agit comme un site de régulation critique de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline.

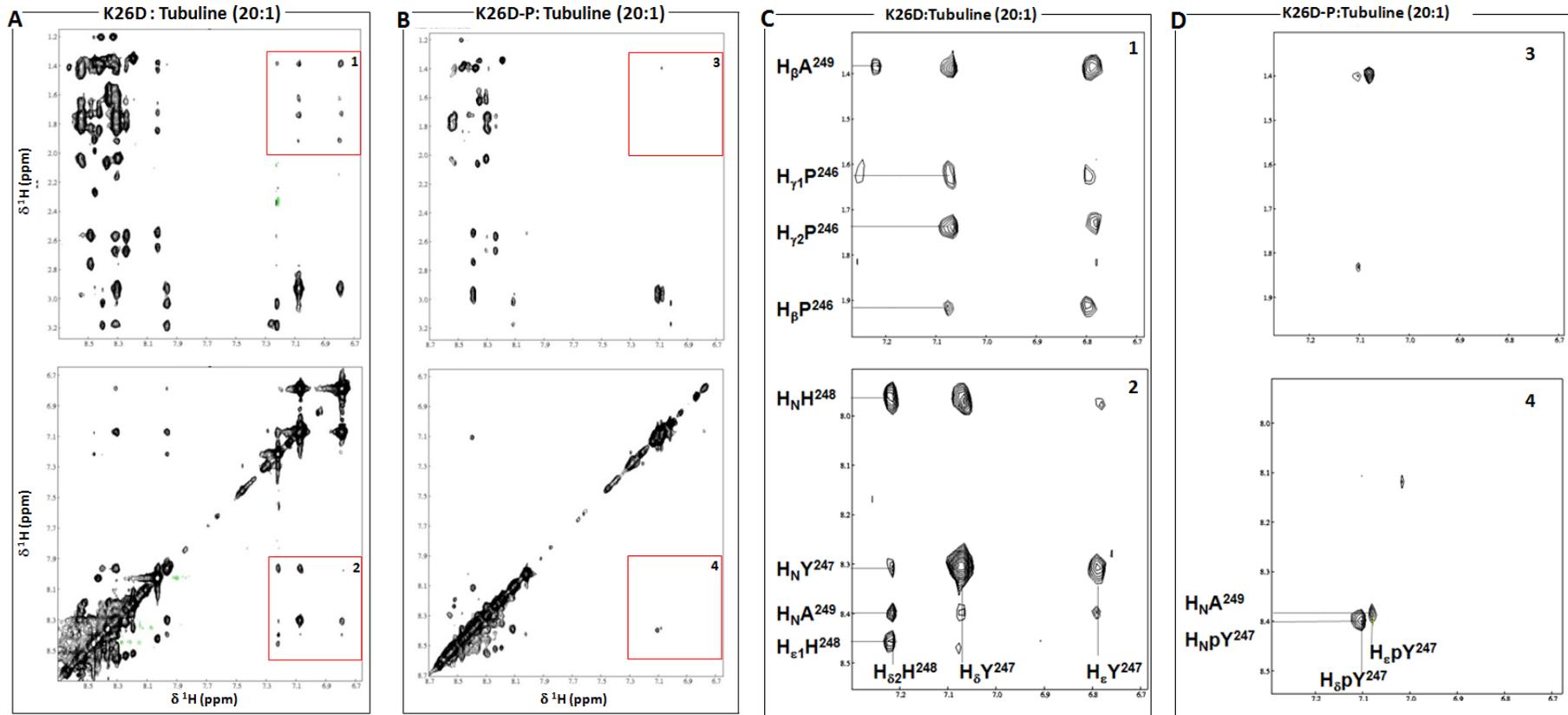


Figure 5.15 : Le peptide K26D-P n'est pas structuré en présence de la tubuline

A) Régions des pics de corrélation des protons amides/aromatiques-protons aliphatiques (en haut) et des protons amides/aromatiques (en bas) du spectre tr-NOESY du peptide K26D à 800 μM en présence de 40 μM de tubuline.

B) Spectre des mêmes régions du peptide K26D-P à 800 μM en présence de 40 μM de tubuline.

C) et D) Agrandissement des régions (1 et 2) de la tr-NOESY du peptide K26D et (3 et 4) de la tr-NOESY du peptide K26D-P. Les pics de corrélation *NOE* séquentiels et à moyenne portée impliquant les résidus P246, Y247, H248 et A249 observés avec le peptide K26D (1 et 2) disparaissent après phosphorylation du peptide K26D sur le résidu Y247 (K26D-P) (3 et 4).

Les spectres ont été acquis dans le tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 °C avec un temps de mélange de 200 ms.

6. Les peptides M19T et K26D semblent interagir simultanément avec la tubuline sur des sites différents

Dans ce travail, un troisième peptide a été utilisé dans le but d'apporter des éléments à la compréhension de la compétition entre la Cx43 et le facteur de transcription Smad2 pour leur liaison au système tubuline/microtubules. Il a été proposé que cette compétition pourrait impliquer le domaine *MH2* de Smad2 (Dai *et al.*, 2007). En s'appuyant sur ce résultat, nous avons d'abord tenté d'identifier la zone d'interaction du domaine *MH2* qui fait environ 200 résidus. Notre choix a porté sur la boucle L3 qui est cruciale pour les interactions protéine-protéine (Lo *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2001) et qui est prédite pour être hautement exposée au solvant (Shi *et al.*, 1997).

Ensuite, nous avons tenté d'identifier des similarités de séquence entre le peptide K26D et le domaine *MH2* de Smad2. Il est intéressant de noter que nous avons obtenu un alignement sans *gap* dans lequel cinq résidus (V240, K241, G242, Y247 et P256) du peptide K26D sont alignés avec la région M419-P435 qui est incluse dans la boucle L3 du domaine *MH2* de Smad2. À partir de ce résultat, nous avons fait synthétiser et nous avons étudié le peptide M19T (M416-T434) qui s'aligne sur quatre résidus (V419, K420, G421 et Y426) avec le peptide K26D (**figure 4.2**).

Nous avons d'abord entrepris l'étude de l'interaction du peptide M19T avec la tubuline avant de procéder aux expériences pour rechercher une éventuelle compétition entre ces peptides pour leur liaison à la tubuline. Nous avons procédé de la même manière que pour l'étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline. Pour cela, nous avons utilisé l'expérience STD-NMR pour sonder cette interaction. Les spectres STD-NMR ont été acquis dans des conditions similaires à celles utilisées pour étudier l'interaction du peptide K26D avec la tubuline.

Nous avons par ailleurs, réalisé des expériences RMN TOCSY et NOESY pour le peptide M19T seul. Leur exploitation a permis de réaliser l'attribution complète des déplacements chimiques de ses protons (^1H) qui sont présentés ci-dessous dans le **tableau 5.4**.

Tableau 5.4 : Attributions des déplacements chimiques des protons du peptide M19T

Résidus	H _N	H _α	H _β	Autres	
M ⁴¹⁶	ND				
S ⁴¹⁷	8,39	4,48	3,765		
F ⁴¹⁸	8,52	4,60	2,92-3,05	H _{δ1} 7,16	H _{ε1} 7,27
V ⁴¹⁹	8,12	3,97	1,90	H _γ 0,83	
K ⁴²⁰	8,44	4,13	1,70	H _γ 1,35	H _δ 1,63 H _ε 2,91
G ⁴²¹	8,38	3,97			
W ⁴²²	8,14	4,59	3,18- 3,26	H _{δ1} 7,158 HH ₂ 7,19	H _{ζ2} 7,44 H _{ε1} 10,12 H _{ζ3} 7,52 H _{ε3} 7,09
G ⁴²³	8,39	3,85			
A ⁴²⁴	8,21	4,15	1,33		
E ⁴²⁵	8,64	4,14	1,86-1,91	H _γ 2,18-2,07	
Y ⁴²⁶	8,06	4,41	2,91-2,91		H _δ 7,00 H _ε 6,72
R ⁴²⁷	8,02	4,18	1,74	H _γ 1,64- 1,48	H _δ 3,08 H _ε 7,17
R ⁴²⁸	8,23	4,18	1,77-1,72	H _γ 1,58	H _δ 3,14 H _ε 7,21
Q ⁴²⁹	8,48	4,34	1,96-2,07	H _γ 2,34	H _{δ1} 6,91 H _{δ2} 7,58
T ⁴³⁰	8,32	4,31	4,14	H _γ 1,14	
V ⁴³¹	8,35	4,20	2,07	H _γ 0,92	
T ⁴³²	8,40	4,40	4,21	H _γ 1,19	
S ⁴³³	8,47	4,54	3,88		
T ⁴³⁴	7,93	4,24	4,14	H _γ 1,14	

ND : non déterminé. M19T 800 μM, tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 °C.

L'analyse du spectre STD-NMR du peptide M19T en présence de la tubuline montre que ce peptide interagit avec la tubuline et que, parmi les quatre acides aminés conservés dans l'alignement K26D-M19T, deux d'entre eux, V419 et Y426, sont situés à proximité de la tubuline (**figure 5.16**). En outre, d'autres résidus d'acides aminés hydrophobes ont été également mis en évidence par cette expérience STD-NMR pour leur implication dans l'interaction avec la tubuline, notamment les résidus F418, W422, A424 et V431.

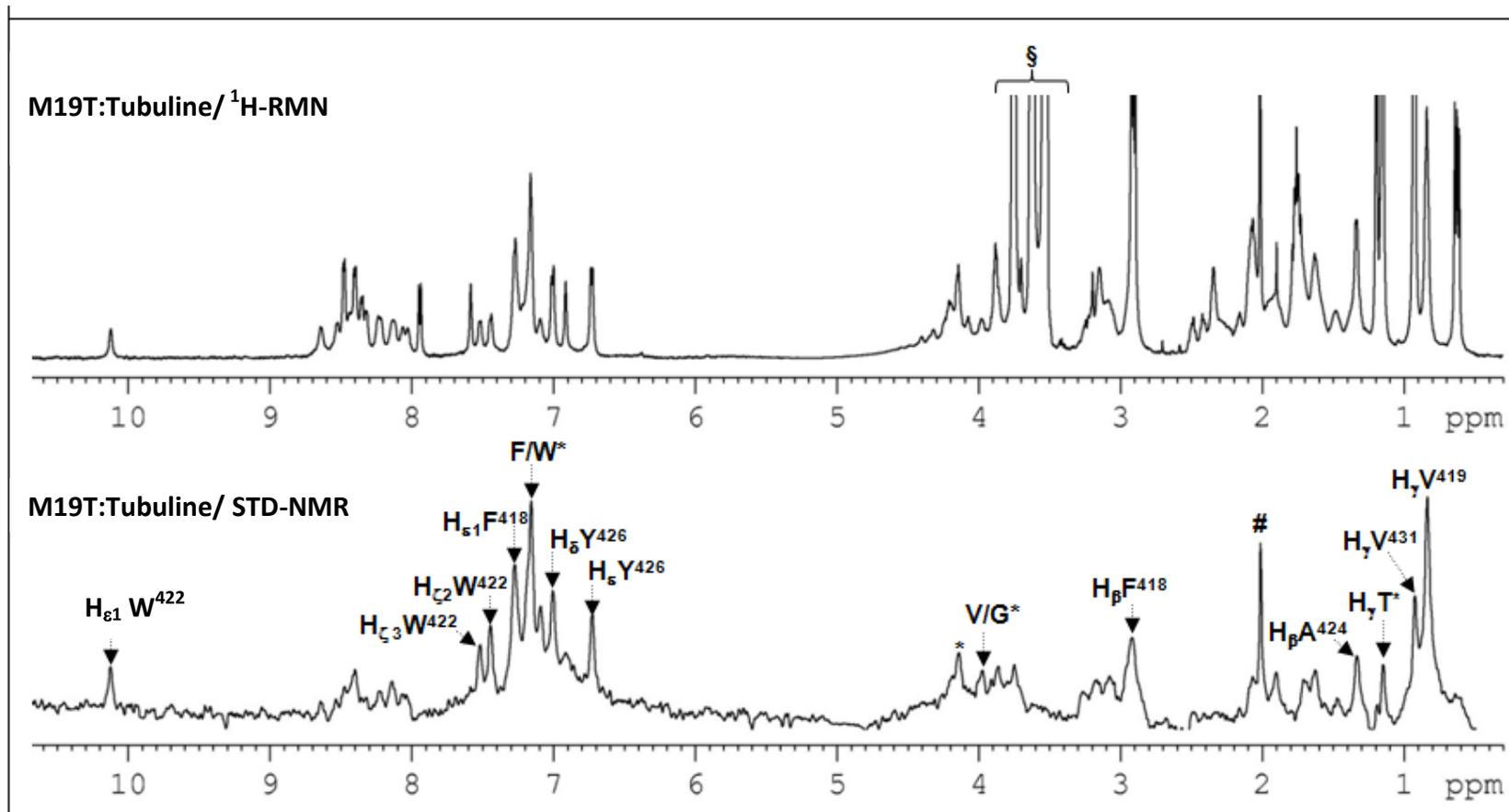


Figure 5.16 : La STD-NMR montre que le peptide M19T interagit avec la tubuline

Spectre RMN 1D du proton et spectre STD-NMR correspondant enregistrés pour le peptide M19T à 800 μM en présence de 40 μM de tubuline. Les protons impliqués dans la liaison du peptide M19T à la tubuline sont indiqués sur le spectre STD-NMR.

* : Attributions ambiguës : T430/T434, V419/G421 et W422/F418.

: Impuretés du peptide.

§ : Déplacement chimique des protons du tampon MES.

Dans un deuxième temps, nous avons examiné la possibilité d'une compétition entre les deux ligands (K26D et M19T) en présence de leur récepteur protéique commun qui est la tubuline. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de STD-NMR (**figure 5.17**) et de tr-NOESY (**figure 5.19**) pour le mélange de ces deux peptides (M19T et K26D) en présence de la tubuline. Malgré la réalisation de plusieurs expériences de compétition en modifiant le rapport molaire entre ces deux peptides (M19T et K26D), suivi par STD-NMR, ces expériences n'ont pas pu mettre en évidence l'existence d'une compétition entre ces deux peptides pour leur liaison à la tubuline.

Dans la **figure 5.18**, nous avons comparé les expériences STD-NMR enregistrées pour les peptides K26D et M19T mis en présence seuls avec la tubuline et pour les deux peptides mis ensemble avec la tubuline. Nous pouvons constater que les protons qui sont impliqués dans l'interaction de chaque peptide avec la tubuline, indiqués sur les spectres proton 1D (**A** pour le peptide K26D et **C** pour le peptide M19T), sont toujours présents dans le spectre STD-NMR noté **F** de l'échantillon qui contient les deux peptides (K26D et M19T) et la tubuline (**figure 5.18**).

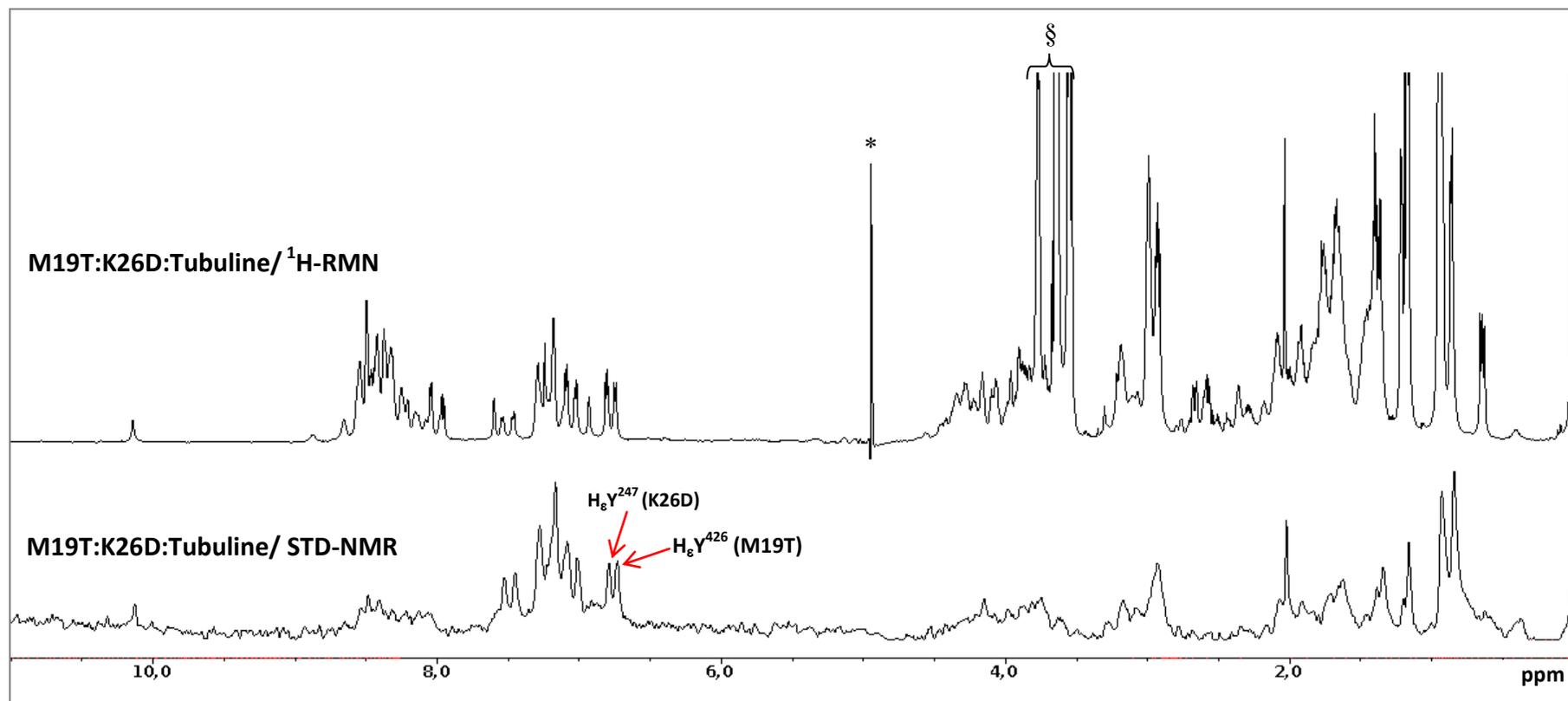


Figure 5.17 : Les peptides K26D et M19T ne semblent pas se lier au même site de la tubuline

Spectre RMN 1D du proton et spectre STD-NMR correspondant enregistrés pour les peptides K26D et M19T à 800 μM mis ensemble en présence de 40 μM de tubuline. Les protons indiqués sur le spectre STD-NMR sont ceux du proton H_ϵ du résidu Y426 du peptide M19T et du proton H_ϵ du résidu Y247 du peptide K26D.

Les spectres ont été acquis dans du tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 °C. Pour les expériences STD-NMR, la tubuline a été saturée par l'application d'une irradiation sélective à -0,5 ppm.

§ : Déplacement chimique des protons du tampon MES.

* : Signal résiduel de l'eau.

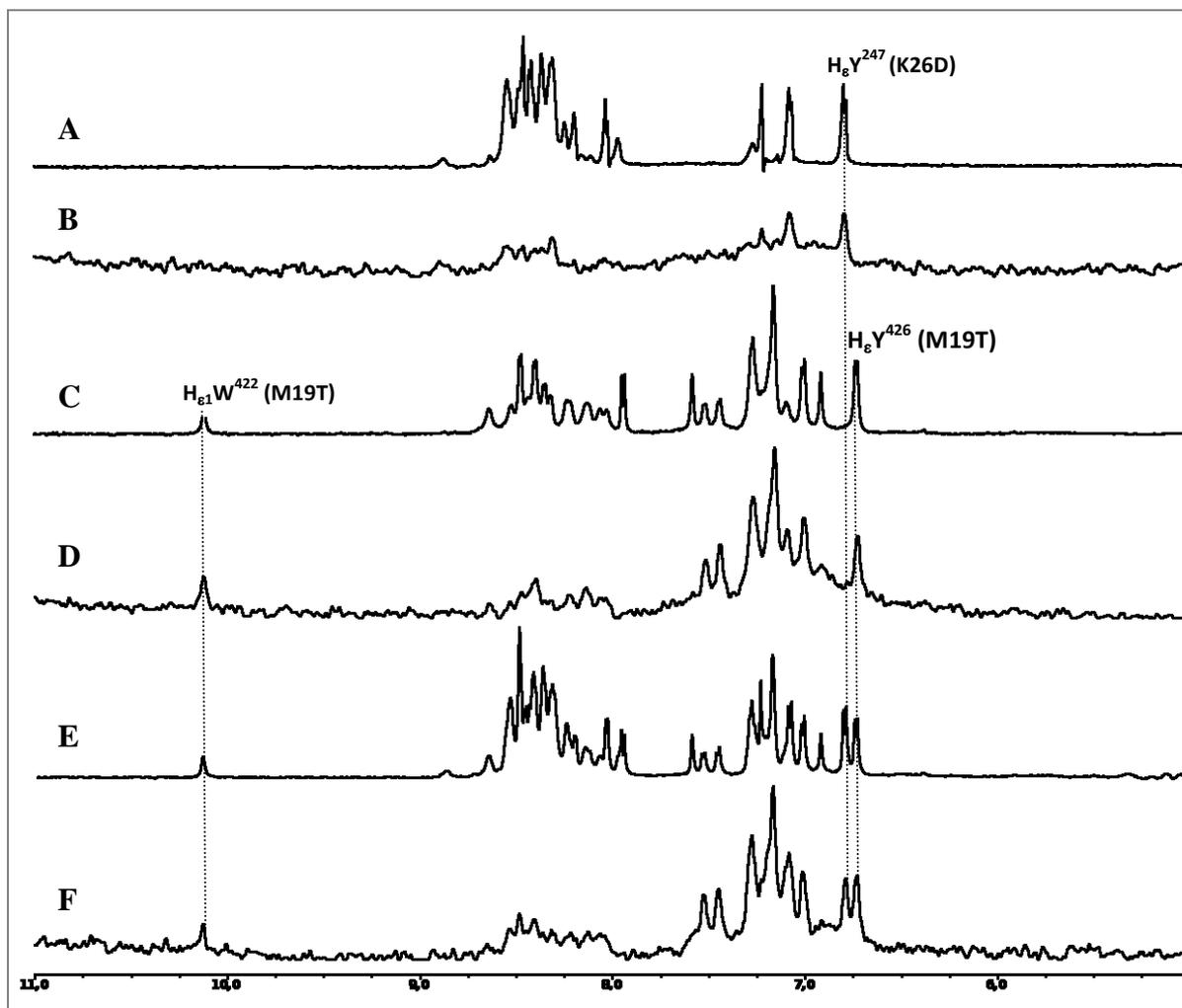


Figure 5.18 : L'expérience STD-NMR des peptides K26D et M19T mis ensemble avec la tubuline montre la présence des mêmes protons impliqués dans leur liaison avec cette protéine

(A) Agrandissement de la région des protons amides/aromatiques des spectres 1D du proton ($1D\text{-}^1\text{H}$) et (B) STD-NMR correspondant enregistrés pour le peptide K26D à $800\ \mu\text{M}$ en présence de $40\ \mu\text{M}$ de tubuline (cf. **figure 5.9**). Le proton indiqué sur le spectre $1D\text{-}^1\text{H}$ est le proton H_ϵ du résidu Y247 du peptide K26D.

(C) Agrandissement de la région des protons amides/aromatiques des spectres 1D du proton et (D) STD-NMR correspondant enregistrés pour le peptide M19T à $800\ \mu\text{M}$ en présence de $40\ \mu\text{M}$ de tubuline (cf. **figure 5.16**). Les protons indiqués sur le spectre $1D\text{-}^1\text{H}$ sont ceux du proton H_ϵ du résidu Y426 et du proton H_ϵ du résidu W422 du peptide M19T.

(E) Agrandissement de la région des protons amides/aromatiques des spectres 1D du proton et (F) STD-NMR correspondant enregistrés pour les deux peptides (K26D et M19T) à $800\ \mu\text{M}$ en présence de $40\ \mu\text{M}$ de tubuline (cf. **figure 5.17**).

Les spectres ont été acquis dans du tampon PIPES deutéré $50\ \text{mM}$ pH 6,4 à $9\ ^\circ\text{C}$.

Pour les expériences STD-NMR, la tubuline a été saturée par l'application d'une irradiation sélective à $-0,5\ \text{ppm}$.

Par ailleurs, nous avons également enregistré une tr-NOESY pour un mélange des deux peptides (M19T et K26D) en présence de tubuline pour rechercher d'éventuels *NOE* échangés entre ces peptides (*NOE* inter-ligands). Le spectre de la tr-NOESY du mélange des peptides (en rouge sur la **figure 5.19**) n'a révélé que la présence des *tr-NOE* propres à chaque peptide en présence de la tubuline. Sur cette figure, les *tr-NOE* du peptide M19T sont présentés en vert et ceux du K26D en violet. La superposition des ces spectres n'a révélé aucun *NOE* inter-ligands entre les peptides K26D et M19T, c'est-à-dire aucun pic rouge sans pic superposé (vert ou violet).

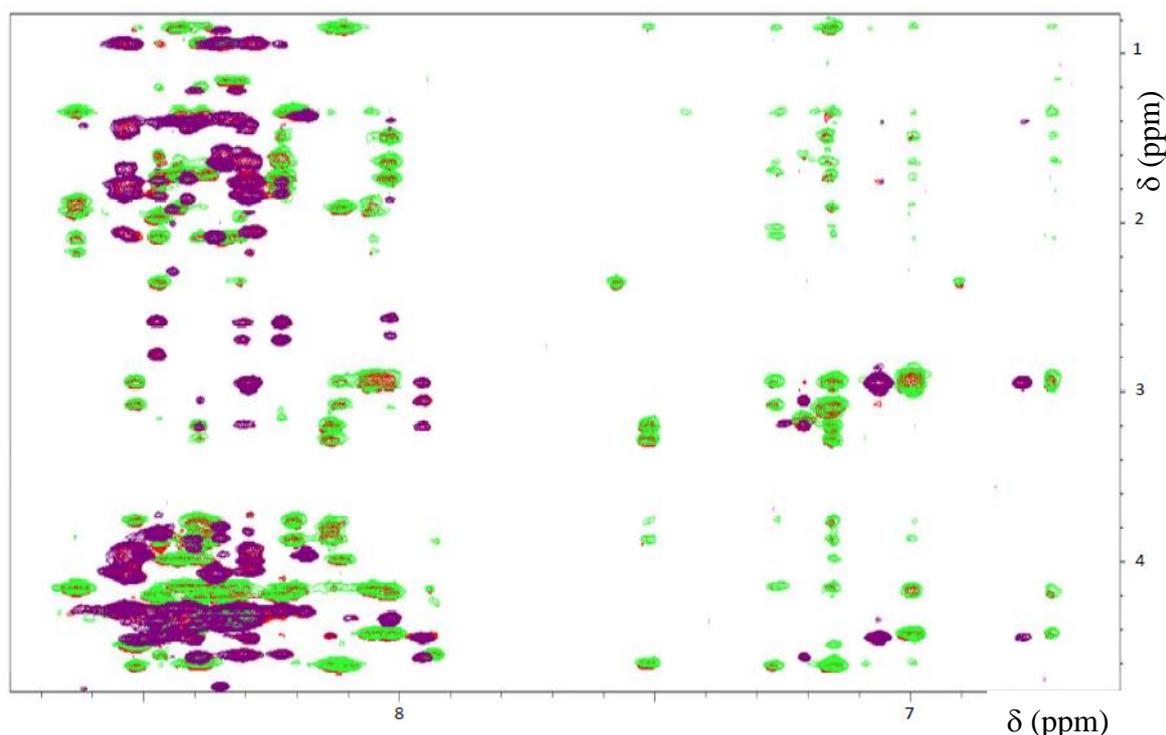


Figure 5.19 : La tr-NOESY du mélange de ligands K26D et M19T ne présente aucun *NOE* inter-ligands

Région des corrélations des protons amides/aromatiques-protons aliphatiques observées dans les trois spectres tr-NOESY du peptide M19T et/ou du peptide K26D à 800 μM en présence de 40 μM tubuline.

Ces spectres sont présentés en couleurs différentes (vert : M19T 800 μM ; violet : K26D 800 μM ; rouge : M19T 800 μM et K26D 800 μM). Les spectres ont été acquis dans du tampon PIPES deutéré 50 mM pH 6,4 à 9 °C.

Les données obtenues à partir des expériences STD-NMR et tr-NOESY réalisées sur le mélange des peptides (M19T et K26D) en présence de la tubuline, suggèrent que les deux peptides M19T et K26D peuvent interagir simultanément avec la tubuline sur des sites de liaison différents non adjacents (séparés par une distance supérieure à 5 Å), sans aucune influence de l'un sur l'autre.

Chapitre VI :

Discussion globale

L'étude de la structure tridimensionnelle des connexines est un moyen indispensable pour éclairer les relations entre conformation et fonction. L'analyse structurale des canaux jonctionnels formés à partir de la protéine recombinante α_1 -Cx263T (Cx43 tronquée du domaine C-terminal) par microscopie cryoélectronique et diffraction électronique a montré que les quatre domaines transmembranaires de chaque sous-unité sont structurés en hélices α (Unger *et al.*, 1997 ; Unger *et al.*, 1999). Par ailleurs, de nombreux travaux utilisant essentiellement la RMN en solution ont été réalisés afin d'élucider les structures des domaines intracytoplasmiques des connexines. Ces travaux ont montré que ces domaines sont généralement désordonnés (NT-Cx32, Kalmatsky *et al.*, 2009) ou présentent des petites régions hélicoïdales comme le domaine N-terminal de la Cx26 (Purnick *et al.*, 2000) et la boucle intracytoplasmique de la Cx43 qui présente cette structure de façon pH-dépendante (Duffy *et al.*, 2002) ou suite à l'interaction avec la calmoduline (Zhou *et al.*, 2007). Le domaine C-terminal de la Cx43 a aussi suscité beaucoup d'intérêt de par sa grande taille (L228-I382) et la présence en son sein de sites d'interaction pour différents ligands intracellulaires (Hervé *et al.*, 2012 ; Laird, 2010). Le travail de Sorgen *et al.* (2004) a révélé que ce domaine est essentiellement non structuré avec deux régions (A315-T326 et D340-A348) en hélice α (Sorgen *et al.*, 2004).

Le premier objectif de notre travail était de caractériser l'interaction entre une partie du domaine C-terminal de la Cx43 et un élément du cytosquelette, le microtubule, connu pour être un partenaire de cette connexine. Dans cette étude, notre choix a porté sur la région juxta-membranaire du domaine C-terminal de la Cx43 en s'appuyant sur les résultats de Giepmans *et al.* (2001b). Pour cela, nous avons fait synthétiser un peptide qui correspond à la région K234-D259 et que nous avons appelé dans ce travail K26D. L'étude de l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules a été réalisée par la RMN en solution qui a démontré que le peptide K26D se lie spécifiquement à ces partenaires. Cette interaction a été confirmée par ailleurs par co-sédimentation.

Nos résultats montrent que le domaine juxta-membranaire K234-D259 de la Cx43 se lie à la tubuline et aux microtubules par la séquence $^{239}\text{RVKKGKSDPYHAT}^{250}$ avec au moins deux groupes de résidus $^{239}\text{RV}^{240}$ et $^{247}\text{YHAT}^{250}$ qui se trouvent à proximité immédiate de ces partenaires. La séquence de liaison R239-T250 retrouvée dans notre étude est différente du motif de liaison à la tubuline $^{234}\text{KGVKDRVKGK}^{243}$ proposé précédemment par Giepmans *et al.* (2001b) et Dai *et al.* (2007) de par sa richesse en acides aminés souvent rencontrés dans les domaines de liaison à la tubuline (V, G, R et K). Cependant, le site de liaison à la tubuline

établi dans notre étude et le motif proposé par ces auteurs ont en commun 5 résidus (R239-243 ; résidus soulignés dans les deux séquences). L'étude de Akiyama *et al.* (2005) a montré que la région juxta-membranaire (227–242) du domaine C-terminal de la Cx43 interagit aussi avec la protéine CIP150 (*Cx43-Interacting Protein of 150 kDa*).

De plus, nos résultats montrent que la séquence de liaison à la tubuline ²⁴⁷YHAT²⁵⁰ inclut la tyrosine 247 (Y247) qui est phosphorylée par la protéine kinase ν -Src. Ce résidu participe à la régulation de la communication cellulaire *via* les canaux jonctionnels (Lin *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2006 ; Solan et Lampe, 2008). Par ailleurs, une étude récente a montré que le résidu lysine 237 (K237) qui se trouve à proximité du site de liaison à la tubuline VK²³⁷D²³⁸RV²⁴⁰ constitue un site de conjugaison pour les protéines SUMO, qui sont des protéines apparentées à l'ubiquitine. Environ 75 % des sumoylations de substrats connues sont effectuées à l'intérieur du motif ψ KXD/E (ψ : résidu apolaire) (Gareau et Lima, 2010). La lysine K237 du domaine C-terminal de la Cx43 ne fait pas partie du motif de sumoylation mais elle est précédée par un résidu hydrophobe (V236), ce qui satisfait partiellement l'exigence du motif ψ KXD/E (Kjenseth *et al.*, 2012). Cette modification post-traductionnelle joue un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires incluant la réparation de l'ADN, la transcription, le transport nucléo-cytoplasmique et la séparation des chromosomes. La plupart des protéines sumoylées sont localisées dans le noyau. Cependant la sumoylation apparaît jouer un rôle critique dans des processus extranucléaires comme la transduction de signal et le trafic des protéines membranaires (Kjenseth *et al.*, 2012). Dans notre étude, les expériences STD-NMR ont révélé l'implication de chaînes latérales de résidus lysine dans l'interaction du peptide K26D avec la tubuline et les microtubules. Cependant nous n'avons pas pu identifier parmi ces résidus lesquels sont à proximité de la tubuline et des microtubules. On ne peut donc tirer à ce jour aucune conclusion sur l'interaction du site potentiel de sumoylation au voisinage de la lysine 237 avec le système tubuline/microtubules mais ce résultat ouvre la voie à de nouvelles perspectives.

De nombreuses études se sont intéressées à l'impact fonctionnel de l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules (Johnson *et al.*, 2002 ; Lauf *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2001 ; Thomas *et al.*, 2005). Ces études rapportent que les microtubules semblent être nécessaires pour un transport efficace de la Cx43 du Golgi à la membrane plasmique. La livraison des héli-canaux constitués de Cx43 peut se faire soit directement à la jonction adhérente (Shaw *et al.*, 2007) soit de façon aléatoire dans des régions non jonctionnelles (Lauf *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2005). Néanmoins, aucune de ces études n'a déterminé la région de la Cx43 qui est impliquée dans ce trafic facilité par les microtubules. L'étude de

Wayakanon *et al.* (2012) suggère que la région ²³⁵GVKDRVKG²⁴² joue un rôle essentiel dans le trafic de la Cx43 le long des microtubules jusqu'à la membrane plasmique. Ces auteurs ont construit plusieurs mutants de la Cx43 tronqués en des positions différentes au niveau du domaine C-terminal, ce qui leur a permis d'attribuer des rôles à certaines régions de ce domaine. Il est intéressant de noter que la région G235-G242 s'est révélée être importante pour l'assemblage de la plaque jonctionnelle à la membrane plasmique (Wayakanon *et al.*, 2012). La région ²³⁵GVKDRVKG²⁴² se superpose avec le motif de liaison à la tubuline établi dans notre étude ²³⁹RV²⁴⁰ (soulignée dans la séquence) ce qui permet de suggérer que ces deux acides aminés font partie du site de liaison à la tubuline et aux microtubules. Ces acides aminés pourraient également être impliqués dans le trafic facilité des connexons de la Cx43 le long des microtubules. Il faut noter que le résultat de Wayakanon *et al.* (2012) ne contredit pas ceux de Fishman *et al.* (1991) et Dunham *et al.* (1992) qui bien que suggérant que l'intégrité du domaine C-terminal de la Cx43 n'est pas nécessaire à l'assemblage de la Cx43 en canaux jonctionnels n'ont pas utilisé des formes tronquées en amont des résidus D245, K241 et S257.

Le deuxième objectif de notre travail était d'apporter des éléments de structure de la région juxta-membranaire (K234-D259) du domaine C-terminal de la Cx43 en interaction avec la tubuline. Notre étude confirme que le peptide K26D se lie spécifiquement à la tubuline.

Les déterminants structuraux de l'interaction de la région juxta-membranaire du domaine C-terminal de la Cx43 avec la tubuline sont proposés. L'étude par RMN du peptide K26D libre en solution montre qu'il est non structuré, alors qu'il adopte une structure comportant trois hélices après sa liaison à la tubuline. Cette conformation diffère de celle rapportée antérieurement utilisant des peptides ou des protéines en interaction avec la tubuline (Clément *et al.*, 2005 ; Ravelli *et al.*, 2004), ce qui suggère l'existence d'une nouvelle structure susceptible de se lier à la tubuline et aux microtubules. La structure du peptide K26D en interaction avec la tubuline présente trois régions hélicoïdales, une hélice α centrale et deux hélices 3_{10} de part et d'autre de l'hélice α . Les hélices 3_{10} se rencontrent aussi dans les protéines, où elles peuvent former des extensions des extrémités N- et C-terminales des hélices α , (Barlow et Thornton, 1988) ou dans les peptides où elles se retrouvent aux extrémités N- et C-terminales (Rohl et Doig, 1996).

L'hélice α centrale du peptide K26D s'étend sur sept résidus, ²⁴⁶PYHATSG²⁵², ce qui est inférieur à la moyenne de 10 résidus pour une hélice α constituée (Barlow et Thornton,

1988). L'hélice 3₁₀ qui se trouve à l'extrémité N-terminale de cette hélice α s'étend sur les résidus ²⁴⁰VKG²⁴² alors que celle de l'extrémité C-terminale s'étend sur les résidus ²⁵⁵SPA²⁵⁷, ce qui correspond à la moyenne de 3,3 résidus pour l'hélice 3₁₀ (Barlow et Thornton, 1988). En examinant les séquences ²⁴⁶PYHATSG²⁵², ²⁴⁰VKG²⁴² et ²⁵⁵SPA²⁵⁷, on retrouve des acides aminés qui favorisent la formation des hélices (Y, H, A) et d'autres qui provoquent plutôt leur rupture (G, S, P), ce qui explique leur présence aux extrémités des hélices (Garrett et Grisham, 2010 ; Richardson, 1981). Il faut noter qu'une face de l'hélice α est constituée de résidus hydrophobes (P, Y et A), alors que l'autre face inclut des résidus hydrophiles (D, H et S), ce qui lui confère un caractère amphiphile qui est probablement en lien avec la stabilité du complexe peptide:tubuline.

Notre travail montre que l'interaction du domaine juxta-membranaire (K234-D259) de la Cx43 avec la tubuline provoque une transition structurale d'un état non structuré (peptide seul) à une structuration compacte (peptide en interaction avec la tubuline). Cela est en accord avec les résultats de Chen *et al.* (2008) et de Kieken *et al.* (2009) qui ont montré que l'interaction de certaines régions du domaine C-terminal de la Cx43 avec des protéines partenaires de la Cx43 provoquait des transitions structurales. L'analyse par cristallographie aux rayons X d'un complexe formé du domaine PDZ2 (PDZ²⁴ : un domaine d'interaction protéine-protéine) de la protéine associée à la jonction serrée ZO-1 et d'un peptide issu du domaine C-terminal de la Cx43 (R374-I382) montre que l'échange des domaines PDZ2 de ZO-1 génère un site de liaison distinct pour le peptide qui s'adapte bien à une poche hydrophobe qui se forme entre ces domaines (Chen *et al.*, 2008). De plus, le travail de Kieken *et al.* (2009) a démontré qu'une région du domaine C-terminal de la Cx43 (T275-P284) adopte une conformation en hélice à pas gauche après son interaction avec le domaine SH3 de la tyrosine kinase *c-Src* (Grosely et Sorgen 2013).

Par ailleurs, d'autres études montrent que la proximité de la membrane stabilise les hélices et notamment dans la région juxta-membranaire du domaine C-terminal de la Cx43 (Grosely *et al.*, 2010 ; Kellezi *et al.*, 2008). Ces auteurs ont réalisé une analyse de structure secondaire par dichroïsme circulaire du domaine C-terminal de la Cx43 attaché au quatrième domaine transmembranaire (*Cx43CT-M4*) ou soluble (*Cx43CT*) et ont constaté que le contenu en hélice est plus important pour le domaine fixé (*Cx43CT-M4*) que pour le domaine soluble

²⁴ Le nom PDZ provient des trois premières protéines où ces domaines ont été identifiés : PSD-95 (Postsynaptic density protein 95), DLG (*Drosophila* tumor suppressor Discs Large) et ZO-1 (*Zonula occludens-1*).

Les domaines PDZ se lient à des séquences de trois résidus de la région C-terminale de leurs partenaires. Le domaine PDZ2 se lie au motif ϕ -X- ϕ -COOH où X représente n'importe quel acide aminé et ϕ un acide aminé hydrophobe (Harris et Lim, 2001).

(Cx43CT). En outre, Grosely *et al.* (2013a) ont caractérisé sept hélices (H1-H7) dans le domaine C-terminal de la Cx43 lié au quatrième domaine transmembranaire (Cx43CT-M4; D196-I382). Ce résultat a été obtenu en calculant les indices de déplacement chimique (CSI)²⁵ à partir des déplacements chimiques des carbones $^{13}\text{C}_\alpha$ et $^{13}\text{C}_\beta$ de ce domaine. Il est intéressant de noter que l'hélice H1 (nommée ainsi par ces auteurs)²⁶ qui correspond à la séquence $^{247}\text{YHATT}^{251}$ du domaine juxta-membranaire de Cx43CT-M4 se superpose avec notre hélice centrale ($^{246}\text{PYHATSG}^{252}$). L'ancrage du domaine C-terminal de la Cx43 à la membrane plasmique semble apporter une certaine stabilité à cette structure. Au delà de cet aspect topologique, la régulation des changements conformationnels indispensables au fonctionnement correct des canaux jonctionnels passe par l'interaction du domaine Cx43CT avec différents partenaires.

Il est bien établi que la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires s'appuie sur des interactions protéine-protéine régulées par différents mécanismes dont les cycles de phosphorylation/déphosphorylation des protéines. La phosphorylation/déphosphorylation est en effet un des mécanismes prépondérant des cascades de transduction de signal où la phosphorylation induit l'interaction ou la perte de l'interaction entre un récepteur et son ligand. Ce mécanisme de régulation par phosphorylation intervient dans la régulation de l'interaction de certains partenaires des microtubules ou de la Cx43. La phosphorylation des protéines associées aux microtubules, notamment de *tau* est un facteur clé dans la régulation de la stabilité des microtubules car elle provoque le détachement de ces protéines associées (Drewes *et al.*, 1995 ; Illenberger *et al.*, 1996).

Une étude récente a révélé que les microtubules interagissent également avec une protéine de la plaque cytoplasmique de la jonction serrée, appelée *cinguline*. Cette étude a aussi montré que la phosphorylation de la *cinguline* régule son interaction avec les microtubules (Yano *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la phosphorylation constitue aussi un moyen important dans la régulation de l'interaction de la Cx43 avec ses partenaires. La grande majorité des phosphorylations de la Cx43 se produit quand la connexine atteint la membrane plasmique (Lampe et Lau 2000 ; Lampe et Lau 2004). Cette modification post-traductionnelle se révèle être essentielle à différents stades de la formation de la plaque jonctionnelle formée à partir de la Cx43.

²⁵ CSI : *chemical shift index* est un algorithme qui permet de déterminer la structure secondaire des protéines à partir des indices des déplacements chimiques du carbone ^{13}C et du proton ^1H (Wishart et Sykes, 1994).

²⁶ Grosely *et al.* (2013a) ont réalisé des constructions de la Cx43 de *Rattus norvegicus* qui possède une séquence différente de la séquence de la Cx43 humaine utilisée dans ce travail.

La phosphorylation est enfin impliquée dans l'internalisation de la Cx43. Leykauf *et al.* (2006) ont démontré que la protéine ubiquitine-ligase E3 de la famille *Nedd4* interagit directement avec le domaine C-terminal de la Cx43 *via* ses domaines WW1, WW2, WW3 (WW²⁷ : domaine d'interaction protéine-protéine qui se lie au motif PY (xPPxY)). Ces auteurs suggèrent que l'interaction de la Cx43 avec la protéine *Nedd4* est modulée par l'état de phosphorylation de celle-ci puisqu'ils ont constaté que le traitement de cellules par le facteur de croissance épidermique (EGF) induit une augmentation de la quantité de la Cx43 phosphorylée, ce qui provoque une augmentation significative de l'interaction du domaine WW3 de la protéine *Nedd4* et la Cx43 phosphorylée.

Des travaux récents ont en outre postulé que la phosphorylation pourrait moduler l'interaction de la Cx43 avec la protéine *ZO-1* *via* son domaine PDZ. Chen et ses collaborateurs (2008) ont travaillé sur des peptides issus du domaine C-terminal de la Cx43 et ont démontré que la phosphorylation de ces peptides diminuait leur interaction avec le domaine PDZ2 de la protéine *ZO-1*. Dunn et Lampe (2014) ont utilisé de leur côté différents mutants de la Cx43 et ont montré que la phosphorylation du résidu S373 de la Cx43 par la protéine kinase Akt provoque la perte de l'interaction entre la Cx43 et la protéine *ZO-1* (Chen *et al.*, 2008 ; Dunn et Lampe, 2014).

Le troisième objectif de ce travail était de déterminer l'impact de la phosphorylation du domaine juxta-membranaire (K234-D259) de la Cx43 sur son interaction avec la tubuline. Pour cela, nous avons fait synthétiser un peptide qui possède la même séquence que le peptide K26D mais qui est phosphorylé au niveau du résidu Y247 et que nous avons appelé K26D-P. Il faut noter que le peptide K26D contient deux sites de phosphorylation (Y247 et S255) impliqués dans la régulation de la communication jonctionnelle intercellulaire. Le résidu Y247 est un site de phosphorylation par la protéine kinase v-*Src* (Lin *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2006 ; Solan et Lampe, 2008). Le résidu S255 est un site de phosphorylation par les protéines MAPK et par les kinases dépendantes des cyclines (CDK1) (Cameron *et al.*, 2003 ; Lampe *et al.*, 1998). Notre choix a porté sur le site de phosphorylation Y247 après avoir mis en évidence par RMN qu'il interagit spécifiquement avec la tubuline et les microtubules.

Nos résultats montrent que la phosphorylation du résidu Y247 est directement impliquée dans la perte de la liaison du domaine juxta-membranaire (K234-D259) de la Cx43 à la tubuline, qui pourrait s'expliquer par un changement constaté de la conformation de ce domaine induit par la phosphorylation du résidu Y247. Une étude récente réalisée par Grosely

²⁷ Le nom WW fait référence à deux résidus tryptophane (W) espacés de 20 à 22 acides aminés qui sont bien conservés dans ce domaine (Bork et Sudol, 1994).

et al. (2013b) suggère que la phosphorylation pourrait altérer la communication jonctionnelle en induisant des changements structuraux du domaine C-terminal de la Cx43. Différents mutants du domaine *Cx43CT-M4*, mimant la phosphorylation (S/D et Y/D), ont été construits. L'analyse des structures secondaires de ces constructions a révélé que la phosphorylation altère le contenu en hélice du domaine *Cx43CT*.

De nombreuses études se sont aussi intéressées à l'impact de la phosphorylation sur la conformation des protéines. Une revue de Cheetham (2004) montre par exemple les conséquences de la phosphorylation sur l'activité d'une série de protéines kinases et l'intérêt de ces informations pour le design d'inhibiteurs.

Plus proche de notre domaine, il est bien établi que la phosphorylation des résidus Y247 et Y265 du domaine C-terminal de la Cx43 est essentielle à l'inhibition de la communication jonctionnelle par la protéine kinase *v-Src*. Néanmoins, ces phosphorylations pourraient participer à d'autres régulations. La phosphorylation du résidu Y265 semble stabiliser l'interaction entre la Cx43 et le domaine *SH2* de la protéine kinase *v-Src* qui se fixe en premier lieu sur une région riche en proline (P274-P284) par son domaine *SH3* (Crow *et al.*, 1990 ; Giepmans *et al.*, 2001a ; Kanemitsu *et al.*, 1997). Lin *et al.*, (2001) suggèrent que la phosphorylation du site Y265 est nécessaire également pour une phosphorylation efficace subséquente du résidu Y247. Ainsi, il semble que la phosphorylation des résidus Y265 et Y247 par *v-Src* pourrait (i) établir et/ou perturber des interactions de la Cx43 avec des partenaires qui contiennent des domaines de liaison des phosphotyrosines *SH2* et *PTB*, (ii) modifier la conformation de la Cx43 à travers un mécanisme indépendant de l'introduction d'une charge négative qui peut interférer avec l'état ouvert du canal formé à partir de la Cx43 (Lin *et al.*, 2006).

A partir de ces informations et de nos données, il apparaît que la protéine kinase *Src* pourrait altérer l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules et que le résidu Y247 pourrait être un site critique dans l'altération de cette interaction comme cela a été suggéré pour le résidu Y265 (Toyofuku *et al.*, 2001). Ces auteurs suggèrent que la phosphorylation du résidu Y265 par la protéine kinase *c-Src* altère l'interaction entre la protéine *ZO-1* et la Cx43 (Toyofuku *et al.*, 2001). Ceci vient appuyer l'idée selon laquelle l'état de phosphorylation de la Cx43 pourrait moduler son interaction avec ses partenaires protéiques (Warn-Cramer et Lau 2004).

Par ailleurs, l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules semble aussi réguler la voie de signalisation du TGF- β en libérant les facteurs de transcription Smad2/3 séquestrés par les microtubules (Dai *et al.*, 2007 ; Dong *et al.*, 2000 ;

Zhu *et al.*, 2004). Dai *et al.* (2007) ont démontré que les protéines Smad2/3 (R-Smad) se lient à la tubuline- β par leur domaine *MH2* qui correspond à la région 274-467 pour Smad2 et 231-425 pour Smad3. Ces auteurs suggèrent que les protéines Smad2/3 pourraient entrer en compétition avec la Cx43 pour leur liaison au système tubuline/microtubules. Ainsi, le quatrième objectif de ce travail était d'étudier la compétition entre le peptide K26D issu du domaine C-terminal de la Cx43 et un autre peptide issu du domaine *MH2* des protéines Smad2 pour leur liaison à la tubuline. Nous avons d'abord entrepris de prédire la zone d'interaction du domaine *MH2* qui fait environ 200 résidus. Notre choix a porté sur une région du domaine *MH2* de Smad2 située dans la boucle L3. Cette boucle est cruciale pour la liaison des R-Smad avec les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (Lo *et al.*, 1998). Elle semble aussi jouer un rôle critique dans l'oligomérisation de ces facteurs de transcription qui passe par un changement de conformation de leur extrémité C-terminale induit par sa phosphorylation (Wu *et al.*, 2001). Elle correspond à une région qui est hautement conservée à l'intérieur du domaine *MH2* des protéines Smad (cf. figure 2.3) et qui, par analogie à la structure cristalline du domaine *MH2* de *Smad4*, forme une structure exposée au solvant et donc susceptible d'interagir avec d'autres protéines (Shi *et al.*, 1997). A partir de ces constatations et en s'appuyant sur les similarités de séquences entre cette région du domaine *MH2* de Smad2/3 et du peptide K26D, nous avons fait synthétiser un peptide qui correspond à la région M416-T434 du domaine *MH2* des protéines Smad2 et que nous avons appelé M19T.

Nos résultats montrent que le peptide M19T issu du domaine *MH2* de Smad2 interagit spécifiquement avec la tubuline. Il faut noter que parmi les quatre acides aminés conservés dans l'alignement K26D-M19T, deux d'entre eux, V419 et Y426, sont situés à proximité de la tubuline. Il est intéressant d'observer que le résidu Y426 constitue un site important de la boucle L3 du domaine *MH2* de Smad2 puisque ce résidu participe aussi bien à la liaison de Smad2 au récepteur membranaire activé par le TGF- β (Lo *et al.*, 1998) qu'à la liaison à l'extrémité C-terminale phosphorylée d'une autre protéine Smad2 (Wu *et al.*, 2001). En outre, d'autres résidus d'acides aminés hydrophobes (F418, W422, A424 et V431) ont été également mis en évidence par l'expérience de STD-NMR pour leur interaction avec la tubuline.

Nous avons ensuite tenté d'objectiver une compétition éventuelle entre les deux ligands (K26D et M19T) pour leur liaison à leur récepteur protéique commun (tubuline) par STD-NMR et *tr*-NOESY. Les expériences *tr*-NOESY pour le mélange des deux peptides M19T et K26D en présence de la tubuline ont révélé la présence des *tr*-NOE similaires à ceux observés lors des expériences de *tr*-NOESY pour chaque peptide en présence de la tubuline et aucun NOE inter-ligand n'a été observé entre ces peptides (K26D et M19T). Les résultats

préliminaires obtenus suggèrent que les deux peptides interagissent simultanément avec la tubuline, sans aucune influence de l'un sur l'autre.

Nos résultats ont permis de délimiter une zone d'interaction avec la tubuline du domaine *MH2* de Smad2 (≈ 200 résidus) à 19 résidus (M416-T434). La boucle L3 du domaine *MH2* de Smad2 constitue un site d'interaction protéine-protéine. Nous décrivons ici pour la première fois que la tubuline est un des partenaires protéiques de cette boucle. Nous avons démontré que le résidu Y426, qui joue un rôle crucial dans la reconnaissance des R-Smad par le récepteur membranaire activé et qui intervient aussi dans la formation de structure oligomérique à partir de ces facteurs de transcription, est impliqué dans l'interaction de la protéine Smad2 avec la tubuline. Nos résultats suggèrent que l'interaction de la boucle L3 avec le système tubuline/microtubules pourrait constituer un mécanisme de régulation de ces facteurs de transcription.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que le domaine juxta-membranaire (K234-D259) de la Cx43 et la région M416-T434 du domaine *MH2* des protéines Smad2 pourraient interagir avec la tubuline simultanément sur des sites de liaison différents. En ce qui concerne l'interférence du domaine C-terminal de Cx43 avec la signalisation du *TGF- β* , nos résultats ne montrent pas une compétition directe entre les deux peptides (K26D et M19T) pour leur liaison à la tubuline. Néanmoins, une telle compétition ne peut être exclue. Il serait judicieux d'utiliser ces peptides mais avec des extensions au niveau de leurs régions N-terminale et/ou C-terminale, notamment l'extension du côté C-terminal du peptide M19T puisque le résidu P435 de ce peptide qui s'aligne avec le résidu P256 du peptide K26D a été retiré de la séquence et qu'il pourrait être essentiel à cette compétition. Ces extensions pourraient générer un encombrement stérique tel que la liaison simultanée des deux peptides devient impossible conduisant à une compétition effective.

Conclusion & Perspectives

Les résultats que nous avons obtenus ont permis de démontrer que la région juxta-membranaire (K234-D259) du domaine C-terminal de la Cx43 interagit spécifiquement avec la tubuline et les microtubules. Nos résultats ont permis également pour la première fois de caractériser les déterminants structuraux de ce domaine en interaction avec ces partenaires. L'interaction du domaine juxta-membranaire (K234-D259) avec la tubuline favorise son repliement en une conformation en hélice, qui est probablement partagée par d'autres partenaires de la tubuline. La caractérisation structurale de cette interaction a en outre révélé qu'au moins deux régions de ce domaine qui sont séparées dans la séquence primaire sont essentielles à cette interaction et se retrouvent rapprochées dans la structure tridimensionnelle de ce domaine lié à la tubuline.

Par ailleurs, nos résultats ont indiqué que le résidu Y247 de la région juxta-membranaire (K234-D259) de la Cx43 est impliqué dans l'interaction de ce domaine avec la tubuline et les microtubules. Ce résidu représente un site de phosphorylation de la Cx43 par la protéine kinase *v-Src*. Le résidu Y247 semble constituer un site de régulation important puisque sa phosphorylation a entraîné la perte de l'interaction entre ce domaine et la tubuline.

Enfin, les données présentées dans ce travail permettent d'apporter quelques éléments nécessaires à la compréhension de l'implication de la Cx43 dans la voie de signalisation par le facteur de croissance TGF- β . Nous avons réussi à caractériser l'interaction entre la tubuline et un peptide issu de la boucle L3 de la protéine Smad2. Cette boucle a déjà été prédite pour être exposée au solvant et pourrait donc constituer un site d'interaction protéine-protéine. Cependant, nos résultats ne prouvent pas une compétition directe entre ce peptide et le peptide qui dérive du domaine juxta-membranaire de la Cx43.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ouvrent la voie vers :

- l'étude de l'impact et des conséquences fonctionnelles de l'interaction du domaine juxta-membranaire de la Cx43 avec la tubuline et les microtubules,
- la compréhension de la régulation des interactions protéine-protéine de la Cx43, en postulant que l'interaction de la Cx43 avec la tubuline et les microtubules est régulée par des cycles de phosphorylation/déphosphorylation et que la phosphotyrosine 247 (pY247) pourrait permettre à la Cx43 d'établir des interactions avec des partenaires contenant des domaines de liaison des phosphotyrosines *SH2* et *PTB*,
- une meilleure compréhension de la régulation de la voie de signalisation par le facteur de croissance TGF- β , en suggérant que la Cx43 pourrait entrer en compétition avec les

protéines Smad2/3 *via* leur boucle L3 pour leur liaison avec le système tubuline/microtubules.

Dans la perspective de valider ces hypothèses énoncées, il serait nécessaire de tester :

- si l'interaction du domaine juxta-membranaire de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules *via* le site ²³⁹RV²⁴⁰ est nécessaire au trafic vésiculaire des connexons de la Cx43 le long des microtubules,
- si le résidu K237 du domaine C-terminal de la Cx43, qui constitue un site de conjugaison pour les protéines *SUMO*, est impliqué dans l'interaction avec le système tubuline/microtubules, ce qui suggérerait que la sumoylation pourrait altérer l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules *via* le site ²³⁹RV²⁴⁰,
- si la phosphorylation du résidu Y247 altère l'interaction de la Cx43 avec le système tubuline/microtubules *in vivo*,
- si l'extension du peptide issu de la protéine Smad2 du côté C-terminal rend impossible la liaison simultanée de Smad2 et des peptides issus du domaine C-terminal de la Cx43 incluant au moins la région K234-D259 pour leur liaison avec le système tubuline/microtubules.

Références bibliographiques

1. Ahmad, S., & Howard, E. W. (2002). Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem. J*, *365*, 693-699.
2. Ai, X., & Pogwizd, S. M. (2005). Connexin 43 downregulation and dephosphorylation in nonischemic heart failure is associated with enhanced colocalized protein phosphatase type 2A. *Circulation research*, *96*(1), 54-63.
3. Ai, Z., Fischer, A., Spray, D. C., Brown, A. M., & Fishman, G. I. (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *Journal of Clinical Investigation*, *105*(2), 161-171.
4. Akiyama, M., Ishida, N., Ogawa, T., Yogo, K., & Takeya, T. (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel Cx43 partner protein CIP150. *Biochemical and biophysical research communications*, *335*(4), 1264-1271.
5. Alushin, G. M., Lander, G. C., Kellogg, E. H., Zhang, R., Baker, D., & Nogales, E. (2014). High-Resolution Microtubule Structures Reveal the Structural Transitions in $\alpha\beta$ -Tubulin upon GTP Hydrolysis. *Cell*, *157*(5), 1117-1129.
6. Amos, L. A. (2000). Focusing-in on microtubules. *Current opinion in structural biology*, *10*(2), 236-241.
7. Amos, L. A., & Schlieper, D. (2005). Microtubules and maps. *Advances in protein chemistry*, *71*, 257-298.
8. Anumonwo, J. M., Taffet, S. M., Gu, H., Chanson, M., Moreno, A. P., & Delmar, M. (2001). The carboxyl terminal domain regulates the unitary conductance and voltage dependence of connexin40 gap junction channels. *Circulation research*, *88*(7), 666-673.
9. Archard, H. O., & Denys, F. R. (1979). Development of annular gap junctions in guinea pig epithelia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *8*(4), 187-197.
10. Baleja, J. D., Moulton, J., & Sykes, B. D. (1990). Distance measurement and structure refinement with NOE data. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, *87*(2), 375-384.
11. Barlow, D. J., & Thornton, J. M. (1988). Helix geometry in proteins. *Journal of molecular biology*, *201*(3), 601-619.
12. Bartels, C., Xia, T. H., Billeter, M., Güntert, P., & Wüthrich, K. (1995). The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *Journal of biomolecular NMR*, *6*(1), 1-10.
13. Basdevant, N., Borgis, D., & Ha-Duong, T. (2007). A coarse-grained protein-protein potential derived from an all-atom force field. *The Journal of Physical Chemistry B*, *111*(31), 9390-9399.

14. Beardslee, M. A., Laing, J. G., Beyer, E. C., & Saffitz, J. E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circulation research*, 83(6), 629-635.
15. Becattini, B., & Pellicchia, M. (2006). SAR by ILOEs: An NMR-Based Approach to Reverse Chemical Genetics. *Chemistry-A European Journal*, 12(10), 2658-2662.
16. Belliveau, D. J., Bani-Yaghoub, M., McGirr, B., Naus, C. C., & Rushlow, W. J. (2006). Enhanced neurite outgrowth in PC12 cells mediated by connexin hemichannels and ATP. *Journal of biological chemistry*, 281(30), 20920-20931.
17. Bennett, M. V. L., Barrio, L. C., Bargiello, T. A., Spray, D. C., Hertzberg, E. L., & Saez, J. C. (1991). Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron*, 6(3), 305-320.
18. Bennett, M. V., & Zukin, R. S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. *Neuron*, 41(4), 495-511.
19. Beyer, E. C., Paul, D. L., & Goodenough, D. A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *The Journal of cell biology*, 105(6), 2621-2629.
20. Bhunia, A., Bhattacharjya, S., & Chatterjee, S. (2012). Applications of saturation transfer difference NMR in biological systems. *Drug discovery today*, 17(9), 505-513.
21. Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Telley, I. A., van Dijk, J., Janke, C., & Surrey, T. (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *The Journal of cell biology*, 183(7), 1223-1233.
22. Bork, P., & Sudol, M. (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin?. *Trends in biochemical sciences*, 19(12), 531-533.
23. Braunschweiler, L., & Ernst, R. R. (1983). Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 53(3), 521-528.
24. Brissette, J. L., Kumar, N. M., Gilula, N. B., Hall, J. E., & Dotto, G. P. (1994). Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6453-6457.
25. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 54(5), 905-921.
26. Bundi, A., & Wüthrich, K. (1979). ¹H-nmr parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers*, 18(2), 285-297.

27. Butkevich, E., Hülsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., & Majoul, I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Current biology*, *14*(8), 650-658.
28. Cameron, S. J., Malik, S., Akaike, M., Lerner-Marmarosh, N., Yan, C., Lee, J. D., Abe J. I. & Yang, J. (2003). Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase 1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(20), 18682-18688.
29. Cao, D., Lin, G., Westphale, E. M., Beyer, E. C., & Steinberg, T. H. (1997). Mechanisms for the coordination of intercellular calcium signaling in insulin-secreting cells. *Journal of Cell Science*, *110*(4), 497-504.
30. Cassimeris, L. (1999). Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Current opinion in cell biology*, *11*(1), 134-141.
31. Cassimeris, L., & Spittle, C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *International review of cytology*, *210*, 163-226.
32. Castoldi, M., & Popov, A. V. (2003). Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization–depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein expression and purification*, *32*(1), 83-88.
33. Cheetham, G. M. (2004). Novel protein kinases and molecular mechanisms of autoinhibition. *Current opinion in structural biology*, *14*(6), 700-705.
34. Chen, J., Pan, L., Wei, Z., Zhao, Y., & Zhang, M. (2008). Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *The EMBO journal*, *27*(15), 2113-2123.
35. Chen, Y. G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., & Massagué, J. (1998). Determinants of specificity in TGF- β signal transduction. *Genes & development*, *12*(14), 2144-2152.
36. Chernov, K. G., Mechulam, A., Popova, N. V., Pastre, D., Nadezhdina, E. S., Skabkina, O. V., Shanina N. A., Vasiliev V. D., Tarrade A., Melki J., Joshi V., Baconnais S., Toma F., Ovchinnikov L. P., & Curmi, P. A. (2008). YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules. *BMC biochemistry*, *9*(1), 23.
37. Clément, M. J., Jourdain, I., Lachkar, S., Savarin, P., Gigant, B., Knossow, M., Toma F., Sobel A., & Curmi, P. A. (2005). N-terminal stathmin-like peptides bind tubulin and impede microtubule assembly. *Biochemistry*, *44*(44), 14616-14625.
38. Clément, M. J., Kuoch, B. T., Ha-Duong, T., Joshi, V., Hamon, L., Toma, F., Curmi, P. A., & Savarin, P. (2009). The stathmin-derived I19L peptide interacts with FtsZ and alters its bundling. *Biochemistry*, *48*(41), 9734-9744.
39. Clément, M. J., Savarin, P., Adjadj, E., Sobel, A., Toma, F., & Curmi, P. A. (2010). Probing interactions of tubulin with small molecules, peptides, and protein fragments by solution nuclear magnetic resonance. *Methods in cell biology*, *95*, 406-447.

40. Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (1982). Theory and applications of the transferred nuclear Overhauser effect to the study of the conformations of small ligands bound to proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 48(3), 402-417.
41. Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (1983). Theory of the time dependent transferred nuclear Overhauser effect: applications to structural analysis of ligand-protein complexes in solution. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 53(3), 423-442.
42. Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (1991). Structures of larger proteins in solution: three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science*, 252(5011), 1390-1399.
43. Corey, R. T., & Pauling, L. (1953). Fundamental dimensions of polypeptide chains. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 141(902), 10-20.
44. Cornilescu, G., Delaglio, F., & Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *Journal of biomolecular NMR*, 13(3), 289-302.
45. Crow, D. S., Beyer, E. C., Paul, D. L., Kobe, S. S., & Lau, A. F. (1990). Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Molecular and cellular biology*, 10(4), 1754-1763.
46. Dai, P., Nakagami, T., Tanaka, H., Hitomi, T., & Takamatsu, T. (2007). Cx43 mediates TGF- β signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Molecular biology of the cell*, 18(6), 2264-2273.
47. Dang, X., Doble, B. W., & Kardami, E. (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Molecular and cellular biochemistry*, 242(1-2), 35-38.
48. Dang, X., Jeyaraman, M., & Kardami, E. (2006). Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. *Molecular and cellular biochemistry*, 289(1-2), 201-207.
49. Dbouk, H. A., Mroue, R. M., El-Sabban, M. E., & Talhouk, R. S. (2009). Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal*, 7(4), 10-1186.
50. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A. D. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of biomolecular NMR*, 6(3), 277-293.
51. Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425(6958), 577-584.
52. Desai, A., & Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1), 83-117.

53. Detrich, H. W., & Williams, R. C. (1978). Reversible dissociation of the $\alpha\beta$ dimer of tubulin from bovine brain. *Biochemistry*, 17(19), 3900-3907.
54. Doble, B. W., Dang, X., Ping, P., Fandrich, R. R., Nickel, B. E., Jin, Y., Cattini, P.A., & Kardami, E. (2004). Phosphorylation of serine 262 in the gap junction protein connexin-43 regulates DNA synthesis in cell-cell contact forming cardiomyocytes. *Journal of cell science*, 117(3), 507-514.
55. Dong, C., Li, Z., Alvarez Jr, R., Feng, X. H., & Goldschmidt-Clermont, P. J. (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF β activity. *Molecular cell*, 5(1), 27-34.
56. Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (1995). Microtubule-associated Protein/Microtubule Affinity-regulating Kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the alzheimer-specific site serine 262. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7679-7688.
57. Duffy, H. S., Sorgen, P. L., Girvin, M. E., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S. M., Delmar M. & Spray, D. C. (2002). pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36706-36714.
58. Dunham, B., Liu, S., Taffet, S., Trabka-Janik, E., Delmar, M., Petryshyn, R., Zheng S., Perzova R., & Vallano, M. L. (1992). Immunolocalization and expression of functional and nonfunctional cell-to-cell channels from wild-type and mutant rat heart connexin43 cDNA. *Circulation research*, 70(6), 1233-1243.
59. Dunn, C. A., & Lampe, P. D. (2014). Injury-triggered Akt phosphorylation of Cx43: a ZO-1-driven molecular switch that regulates gap junction size. *Journal of cell science*, 127(2), 455-464.
60. Eiberger, J., Degen, J., Romualdi, A., Deutsch, U., Willecke, K., & Söhl, G. (2001). Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell communication and adhesion*, 8(4-6), 163-165.
61. Elias, L. A., Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, 448(7156), 901-907.
62. Evans, W., De Vuyst, E., & Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem. J*, 397, 1-14.
63. Falk, M. M., & Gilula, N. B. (1998). Connexin membrane protein biosynthesis is influenced by polypeptide positioning within the translocon and signal peptidase access. *Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 7856-7864.
64. Falk, M. M., Buehler, L. K., Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1997). Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *The EMBO journal*, 16(10), 2703-2716.

65. Falk, M. M., Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1994). Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *The Journal of cell biology*, 127(2), 343-355.
66. Fiaux, J., Bertelsen, E. B., Horwich, A. L., & Wüthrich, K. (2002). NMR analysis of a 900K GroEL–GroES complex. *Nature*, 418(6894), 207-211.
67. Fishman, G. I., Moreno, A. P., Spray, D. C., & Levinwand, L. A. (1991). Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3525-3529.
68. Flory P. J., 1969, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*; Wiley-Interscience: New York; p 253.
69. Foote, C. I., Zhou, L., Zhu, X., & Nicholson, B. J. (1998). The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *The Journal of cell biology*, 140(5), 1187-1197.
70. Fort, A. G., Murray, J. W., Dandachi, N., Davidson, M. W., Dermietzel, R., Wolkoff, A. W., & Spray, D. C. (2011). In vitro motility of liver connexin vesicles along microtubules utilizes kinesin motors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 22875-22885.
71. Foster, M. P., McElroy, C. A., & Amero, C. D. (2007). Solution NMR of large molecules and assemblies. *Biochemistry*, 46(2), 331-340.
72. Francis, R., Xu, X., Park, H., Wei, C. J., Chang, S., Chatterjee, B., & Lo, C. (2011). Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PloS one*, 6(10), e26379.
73. Fukushige, T., Siddiqui, Z. K., Chou, M., Culotti, J. G., Gogonea, C. B., Siddiqui, S. S., & Hamelin, M. (1999). MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *Journal of cell science*, 112(3), 395-403.
74. Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., Sosinsky G. E., Tsien R. Y., & Ellisman, M. H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science*, 296(5567), 503-507.
75. Gardner, K. H., & Kay, L. E. (1997). Production and incorporation of ¹⁵N, ¹³C, ²H (¹H- δ 1 methyl) isoleucine into proteins for multidimensional NMR studies. *Journal of the American Chemical Society*, 119(32), 7599-7600.
76. Gardner, K. H., & Kay, L. E. (1998). The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27(1), 357-406.
77. Gareau, J. R., & Lima, C. D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), 861-871.
78. Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (2010). *Biochemistry*, Brooks. Cole, Cengage learning, 321-323. pp.94, 149, 96-97.

79. George, C. H., Kendall, J. M., & Evans, W. H. (1999). Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8678-8685.
80. Giepman, B. N. (2004). Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular Research*, 62(2), 233-245.
81. Giepman, B. N., & Moolenaar, W. H. (1998). The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Current Biology*, 8(16), 931-934.
82. Giepman, B. N., Hengeveld, T., Postma, F. R., & Moolenaar, W. H. (2001a). Interaction of c-Src with Gap Junction Protein Connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8544-8549.
83. Giepman, B. N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M. M., & Moolenaar, W. H. (2001b). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Current Biology*, 11(17), 1364-1368.
84. Gigant, B., Curmi, P. A., Martin-Barbey, C., Charbaut, E., Lachkar, S., Lebeau, L., Siavoshian, S., Sobel, A., & Knossow, M. (2000). The 4 Å X-ray structure of a tubulin: stathmin-like domain complex. *Cell*, 102(6), 809-816.
85. Gigant, B., Martin-Barbey, C., Curmi, P. A., Sobel, A., & Knossow, M. (2003). [The stathmin-tubulin interaction and the regulation of the microtubule assembly]. *Pathologie-biologie*, 51(1), 33-38.
86. Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R. B., Roussi, F., Steinmetz, M. O., Curmi, P. A., Sobel, A., & Knossow, M. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, 435(7041), 519-522.
87. Ginzberg, R. D., & Gilula, N. B. (1979). Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst sensory epithelium. *Developmental biology*, 68(1), 110-129.
88. Girão, H., Catarino, S., & Pereira, P. (2009). Eps15 interacts with ubiquitinated Cx43 and mediates its internalization. *Experimental cell research*, 315(20), 3587-3597.
89. Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(4), 285-295.
90. Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(1), a002576.
91. Goodenough, D. A., Goliger, J. A., & Paul, D. L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry*, 65(1), 475-502.
92. Goubaeva, F., Mikami, M., Giardina, S., Ding, B., Abe, J., & Yang, J. (2007). Cardiac mitochondrial connexin 43 regulates apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(1), 97-103.

93. Govindarajan, R., Chakraborty, S., Johnson, K. E., Falk, M. M., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., & Mehta, P. P. (2010). Assembly of connexin43 into gap junctions is regulated differentially by E-cadherin and N-cadherin in rat liver epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, *21*(23), 4089-4107.
94. Grosely, R., & Sorgen, P. L. (2013). A History of Gap Junction Structure: Hexagonal Arrays to Atomic Resolution. *Cell Communication and Adhesion*, *20*(1-2), 11-20.
95. Grosely, R., Kieken, F., & Sorgen, P. L. (2010). Optimizing the solution conditions to solve the structure of the connexin43 carboxyl terminus attached to the 4th transmembrane domain in detergent micelles. *Cell Communication and Adhesion*, *17*(2), 23-33.
96. Grosely, R., Kieken, F., & Sorgen, P. L. (2013a). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N backbone resonance assignments of the connexin43 carboxyl terminal domain attached to the 4th transmembrane domain in detergent micelles. *Biomolecular NMR assignments*, *7*(2), 299-303.
97. Grosely, R., Kopanic, J. L., Nabors, S., Kieken, F., Spagnol, G., Al-Mugotir, M., Zach, S., & Sorgen, P. L. (2013b). Effects of Phosphorylation on the Structure and Backbone Dynamics of the Intrinsically Disordered Connexin43 C-terminal Domain. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(34), 24857-24870.
98. Grzesiek, S., Anglister, J., & Bax, A. (1993). Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in ¹³C/¹⁵N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of ¹³C Magnetization. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, *101*(1), 114-119.
99. Gu, S., Yu, X. S., Yin, X., & Jiang, J. X. (2003). Stimulation of lens cell differentiation by gap junction protein connexin 45.6. *Investigative ophthalmology & visual science*, *44*(5), 2103-2111.
100. Guo, Y., Martinez-Williams, C., & Rannels, D. E. (2003). Gap junction-microtubule associations in rat alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *285*(6), L1213-L1221.
101. Haefliger, J. A., Bruzzone, R., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., & Paul, D. L. (1992). Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(3), 2057-2064.
102. Harris, B. Z., & Lim, W. A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of cell science*, *114*(18), 3219-3231.
103. Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGFβ signaling. *Cell and tissue research*, *347*(1), 21-36.
104. Hervé, J. C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., & Duffy, H. S. (2007). Gap junctional complexes: from partners to functions. *Progress in biophysics and molecular biology*, *94*(1), 29-65.
105. Hirokawa, N. & Takemura, R. (2004). Microtubule-associated proteins. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, *2*, 676-682.

106. Hirst-Jensen, B. J., Sahoo, P., Kieken, F., Delmar, M., & Sorgen, P. L. (2007). Characterization of the pH-dependent interaction between the gap junction protein connexin43 carboxyl terminus and cytoplasmic loop domains. *Journal of biological chemistry*, 282(8), 5801-5813.
107. Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D., & Scrimgeour, K. G. (1994). *Principes de Biochimie. Édité par De Boeck*. 79-95.
108. Huang, X., & Miller, W. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics*, 12(3), 337-357. (<http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>)
109. Huang, Y., Sirkowski, E. E., Stickney, J. T., & Scherer, S. S. (2005). Prenylation-defective human connexin32 mutants are normally localized and function equivalently to wild-type connexin32 in myelinating Schwann cells. *The Journal of neuroscience*, 25(31), 7111-7120.
110. Hunter, A. W., Caplow, M., Coy, D. L., Hancock, W. O., Diez, S., Wordeman, L., & Howard, J. (2003). The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Molecular cell*, 11(2), 445-457.
111. Hwang, T. L., & Shaka, A. J. (1995). Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 112(2), 275-279.
112. Illenberger, S., Drewes, G., Trinczek, B., Biernat, J., Meyer, H. E., Olmsted, J. B., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (1996). Phosphorylation of Microtubule-associated Proteins MAP2 and MAP4 by the Protein Kinase p110. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10834-10843.
113. Ishima, R., & Torchia, D. A. (2000). Protein dynamics from NMR. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(9), 740-743.
114. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains (1970). Tentative rules (1969). *Biochemistry*, 121, 577-585.
115. Jiang, J. X., & Gu, S. (2005). Gap junction-and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711(2), 208-214.
116. John, S. A., & Revel, J. P. (1991). Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochemical and biophysical research communications*, 178(3), 1312-1318.
117. Johnson, B. A., & Blevins, R. A. (1994). NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *Journal of biomolecular NMR*, 4(5), 603-614.
118. Johnson, R. G., Meyer, R. A., Li, X. R., Preus, D. M., Tan, L., Grunenwald, H., Paulson, A. F., Laird, D. W., & Sheridan, J. D. (2002). Gap junctions assemble in the

- presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Experimental cell research*, 275(1), 67-80.
119. Johnstone, S. R., Billaud, M., Lohman, A. W., Taddeo, E. P., & Isakson, B. E. (2012). Posttranslational modifications in connexins and pannexins. *The Journal of membrane biology*, 245(5-6), 319-332.
 120. Kalmatsky, B. D., Bhagan, S., Tang, Q., Bargiello, T. A., & Dowd, T. L. (2009). Structural studies of the N-terminus of Connexin 32 using ¹H NMR spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 490(1), 9-16.
 121. Kalra, J., Shao, Q., Qin, H., Thomas, T., Alaoui-Jamali, M. A., & Laird, D. W. (2006). Cx26 inhibits breast MDA-MB-435 cell tumorigenic properties by a gap junctional intercellular communication-independent mechanism. *Carcinogenesis*, 27(12), 2528-2537.
 122. Kameritsch, P., Pogoda, K., & Pohl, U. (2012). Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(8), 1993-2001.
 123. Kanemitsu, M. Y., Loo, L. W., Simon, S., Lau, A. F., & Eckhart, W. (1997). Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22824-22831.
 124. Kardami, E., Dang, X., Iacobas, D. A., Nickel, B. E., Jeyaraman, M., Srisakuldee, W., Makazana, J., Tanguy S., & Spray, D. C. (2007). The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Progress in biophysics and molecular biology*, 94(1), 245-264.
 125. Karpen, M. E., De Haseth, P. L., & Neet, K. E. (1992). Differences in the amino acid distributions of 310-helices and α -helices. *Protein Science*, 1(10), 1333-1342.
 126. Kaverina, I., & Straube, A. (2011, December). Regulation of cell migration by dynamic microtubules. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 9, pp. 968-974). Academic Press.
 127. Keeler, J. (2002). *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons, pp.2.2.
 128. Kellezi, A., Grosely, R., Kieken, F., Borgstahl, G. E., & Sorgen, P. L. (2008). Purification and reconstitution of the connexin43 carboxyl terminus attached to the 4th transmembrane domain in detergent micelles. *Protein expression and purification*, 59(2), 215-222.
 129. Kelly, M. J., Ball, L. J., Krieger, C., Yu, Y., Fischer, M., Schiffmann, S., Schmieder, P., Kühne, R., Bermel, W., Bacher, A., Richter, G., & Oschkinat, H. (2001). The NMR structure of the 47-kDa dimeric enzyme 3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase and ligand binding studies reveal the location of the active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13025-13030.
 130. Kieken, F., Mutsaers, N., Dolmatova, E., Virgil, K., Wit, A. L., Kellezi, A., Hirst-Jensen B. J., Duffy, H. S. & Sorgen, P. L. (2009). Structural and molecular

- mechanisms of gap junction remodeling in epicardial border zone myocytes following myocardial infarction. *Circulation research*, 104(9), 1103-1112.
131. Kjenseth, A., Fykerud, T. A., Sirnes, S., Bruun, J., Yohannes, Z., Kolberg, M., Omori Y., Rivedal E., & Leithe, E. (2012). The gap junction channel protein connexin 43 is covalently modified and regulated by SUMOylation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15851-15861.
 132. Kline-Smith, S. L., & Desai, A. (2004). Kinesins as microtubule disassembly enzymes. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2, 517-521.
 133. Koradi, R., Billeter, M., & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 51-55.
 134. Koval, M., Harley, J. E., Hick, E., & Steinberg, T. H. (1997). Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *The Journal of cell biology*, 137(4), 847-857.
 135. Kumar, A., Ernst, R. R., & Wüthrich, K. (1980). A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochemical and biophysical research communications*, 95(1), 1-6.
 136. Kumar, N. M. (1999) *Molecular Biology of the Interactions between Connexins, Gap Junction-Mediated Intercellular Signalling in Health and Disease*, Wiley, Chichester (*Novartis Foundation Symposium* 219) pp 6-21.
 137. Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1992, February). Molecular biology and genetics of gap junction channels. In *Seminars in cell biology* (Vol. 3, No. 1, pp. 3-16). Academic Press.
 138. Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3), 381-388.
 139. Lacroix, B., Van Dijk, J., Gold, N. D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Daniel, W., Gerlich, D., W., & Janke, C. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *The Journal of cell biology*, 189(6), 945-954.
 140. Laing, J. G., & Beyer, E. C. (1995). The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), 26399-26403.
 141. Laing, J. G., Tadros, P. N., Westphale, E. M., & Beyer, E. C. (1997). Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Experimental cell research*, 236(2), 482-492.
 142. Laird, D. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J*, 394, 527-543.

143. Laird, D. W. (2010). The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends in cell biology*, 20(2), 92-101.
144. Laird, D. W., Castillo, M., & Kasprzak, L. (1995). Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *The Journal of cell biology*, 131(5), 1193-1203.
145. Lampe, P. D., & Lau, A. F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 384(2), 205-215.
146. Lampe, P. D., & Lau, A. F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(7), 1171-1186.
147. Lampe, P. D., Kurata, W. E., Warn-Cramer, B. J., & Lau, A. F. (1998). Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *Journal of cell science*, 111(6), 833-841.
148. Lampe, P. D., TenBroek, E. M., Burt, J. M., Kurata, W. E., Johnson, R. G., & Lau, A. F. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *The Journal of cell biology*, 149(7), 1503-1512.
149. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
150. Lauf, U., Giepmans, B. N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S. C., & Falk, M. M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10446-10451.
151. Le, A. C. N., & Musil, L. S. (2001). A novel role for FGF and extracellular signal-regulated kinase in gap junction-mediated intercellular communication in the lens. *The Journal of cell biology*, 154(1), 197-216.
152. Leithe, E., Sirnes, S., Fykerud, T., Kjenseth, A., & Rivedal, E. (2012). Endocytosis and post-endocytic sorting of connexins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(8), 1870-1879.
153. Leykauf, K., Salek, M., Bomke, J., Frech, M., Lehmann, W. D., Dürst, M., & Alonso, A. (2006). Ubiquitin protein ligase Nedd4 binds to connexin43 by a phosphorylation-modulated process. *Journal of cell science*, 119(17), 3634-3642.
154. Li, H., DeRosier, D. J., Nicholson, W. V., Nogales, E., & Downing, K. H. (2002). Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure*, 10(10), 1317-1328.
155. Lin, R., Martyn, K. D., Guyette, C. V., Lau, A. F., & Warn-Cramer, B. J. (2006). v-Src tyrosine phosphorylation of connexin43: regulation of gap junction communication and effects on cell transformation. *Cell Communication and Adhesion*, 13(4), 199-216.

156. Lin, R., Warn-Cramer, B. J., Kurata, W. E., & Lau, A. F. (2001). v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *The Journal of cell biology*, 154(4), 815-828.
157. Lo, R. S., Chen, Y. G., Shi, Y., Pavletich, N. P., & Massagué, J. (1998). The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF- β receptors. *The EMBO journal*, 17(4), 996-1005.
158. Löwe, J., & Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391(6663), 203-206.
159. Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., & Tsukihara, T. (2009). Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*, 458(7238), 597-602.
160. Makowski, L., Caspar, D. L. D., Phillips, W. C., & Goodenough, D. A. (1977). Gap junction structures: Analysis of the x-ray diffraction data. *The Journal of cell biology*, 74(2), 629-645.
161. Malliavin, T., & Dardel, F. (2002) Structure des protéines par RMN. Techniques de l'ingénieur, AF6608, 1-14.
162. Manna, T., Thrower, D., Miller, H. P., Curmi, P., & Wilson, L. (2006). Stathmin strongly increases the minus end catastrophe frequency and induces rapid treadmilling of bovine brain microtubules at steady state in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2071-2078.
163. Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E., & Wüthrich K., (1998) Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB inter-union task group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy, *European Journal of Biochemistry*, 256, 1-15
164. Marsh, R. E., & Donohue, J. (1967). Crystal structure studies of amino acids and peptides. *Advances in protein chemistry*, 22, 235-256.
165. Martin, P. E., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R. J., & Evans, W. H. (2001). Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *Journal of cell science*, 114(21), 3845-3855.
166. Massagué, J., & Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *The EMBO journal*, 19(8), 1745-1754.
167. Matsuuchi, L., & Naus, C. C. (2013). Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(1), 94-108.
168. Mayer, M., & Meyer, B. (1999). Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(12), 1784-1788.

169. Mayer, M., & Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(25), 6108-6117.
170. McNutt, N. S., & Weinstein, R. S. (1970). The ultrastructure of the nexus. A Correlated Thin-Section and Freeze-Cleave Study. *The Journal of cell biology*, *47*(3), 666-688.
171. Meurer-Grob, P., Kasparian, J., & Wade, R. H. (2001). Microtubule structure at improved resolution. *Biochemistry*, *40*(27), 8000-8008.
172. Meyer, B., & Peters, T. (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie International Edition*, *42*(8), 864-890.
173. Meyer, R. A., Laird, D. W., Revel, J. P., & Johnson, R. G. (1992). Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *The Journal of cell biology*, *119*(1), 179-189.
174. Milks, L. C., Kumar, N. M., Houghten, R., Unwin, N., & Gilula, N. B. (1988). Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *The EMBO journal*, *7*(10), 2967-2975.
175. Mitchison, T., & Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *nature*, *312*(5991), 237-242.
176. Moorby, C., & Patel, M. (2001). Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Experimental cell research*, *271*(2), 238-248.
177. Moore, A. T., Rankin, K. E., Von Dassow, G., Peris, L., Wagenbach, M., Ovechkina, Y., Andrieux, A., Job D., & Wordeman, L. (2005). MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. *The Journal of cell biology*, *169*(3), 391-397.
178. Morley, G. E., Taffet, S. M., & Delmar, M. (1996). Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophysical journal*, *70*(3), 1294-1302.
179. Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., & Heldin, C. H. (2001). Smad regulation in TGF- β signal transduction. *Journal of cell science*, *114*(24), 4359-4369.
180. Musil, L. S., & Goodenough, D. A. (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *The Journal of Cell Biology*, *115*(5), 1357-1374.
181. Musil, L. S., & Goodenough, D. A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, *74*(6), 1065-1077.
182. Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T., & Sawada, N. (2006). Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight

- junctions of brain and lung endothelial cells. *Journal of cellular physiology*, 208(1), 123-132.
183. Nakajima, R., Tsai, M.-Y. & Zheng, Y. (2004). Centrosomes and Microtubule Nucleation. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 1, 372-376.
184. Nawrotek, A., Knossow, M., & Gigant, B. (2011). The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-tubulin. *Journal of molecular biology*, 412(1), 35-42.
185. Nicholson, B. J. (2003). Gap junctions—from cell to molecule. *Journal of cell science*, 116(22), 4479-4481.
186. Nogales, E. (2004). Tubulin and its Isoforms. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 4, 272-276.
187. Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A., & Löwe, J. (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 5(6), 451-458.
188. Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., & Downing, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 96(1), 79-88.
189. Nogales, E., Wolf, S. G., & Downing, K. H. (1998b). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391(6663), 199-203.
190. Olk, S., Zoidl, G., & Dermietzel, R. (2009). Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(11), 1000-1016.
191. Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., & Sosinsky, G. E. (2007). Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10034-10039.
192. Oyamada, M., Kimura, H., Oyamada, Y., Miyamoto, A., Ohshika, H., & Mori, M. (1994). The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Experimental cell research*, 212(2), 351-358.
193. Pahujaa, M., Anikin, M., & Goldberg, G. S. (2007). Phosphorylation of connexin43 induced by Src: regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Experimental cell research*, 313(20), 4083-4090.
194. Pauling, L., & Corey, R. B. (1951a). Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(11), 729-740.
195. Pauling, L., & Corey, R. B. (1951b). The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(5), 251-256.

196. Pauling, L., Corey, R. B., & Branson, H. R. (1951). The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37(4), 205-211.
197. Paulson, A. F., Lampe, P. D., Meyer, R. A., TenBroek, E., Atkinson, M. M., Walseth, T. F., & Johnson, R. G. (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *Journal of Cell Science*, 113(17), 3037-3049.
198. Pellecchia, M., Sem, D. S., & Wüthrich, K. (2002). NMR in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(3), 211-219.
199. Peng, H. B. (1983). Cytoskeletal organization of the presynaptic nerve terminal and the acetylcholine receptor cluster in cell cultures. *The Journal of cell biology*, 97(2), 489-498.
200. Peracchia, C. (2004). Chemical gating of gap junction channels: Roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1662(1), 61-80.
201. Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R., & Kreis, T. E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*, 96(4), 517-527.
202. Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J. K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., & Job, D. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *The Journal of cell biology*, 174(6), 839-849.
203. Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A. T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., & Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *The Journal of cell biology*, 185(7), 1159-1166.
204. Piotto, M., Saudek, V., & Sklenář, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of biomolecular NMR*, 2(6), 661-665.
205. Purnick, P. E., Benjamin, D. C., Verselis, V. K., Bargiello, T. A., & Dowd, T. L. (2000). Structure of the amino terminus of a gap junction protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 381(2), 181-190.
206. Qin, H., Shao, Q., Curtis, H., Galipeau, J., Belliveau, D. J., Wang, T., Alaoui-Jamali, M. A., & Laird, D. W. (2002). Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29132-29138.
207. Rajashankar, K. R., & Ramakumar, S. (1996). π -Turns in proteins and peptides: Classification, conformation, occurrence, hydration and sequence. *Protein science*, 5(5), 932-946.

208. Ramachandran G.N. & Sasisekharan V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in protein chemistry*, 23, 283-438.
209. Ramachandran, G. N., Kolaskar, A. S., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (1974). The mean geometry of the peptide unit from crystal structure data. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 359(2), 298-302.
210. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. T., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of molecular biology*, 7(1), 95-99.
211. Ravelli, R. B., Gigant, B., Curmi, P. A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., & Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, 428(6979), 198-202.
212. Reynhout, J. K., Lampe, P. D., & Johnson, R. G. (1992). An activator of protein kinase C inhibits gap junction communication between cultured bovine lens cells. *Experimental cell research*, 198(2), 337-342.
213. Richardson, J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in protein chemistry*, 34, 167-339.
214. Rodríguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., López, D., Torre, I., Morente, M., Abellán, A., Miro, E., Ruiz-Meana, M., & García-Dorado, D. (2007). The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 94(1), 219-232.
215. Rohl, C. A., & Doig, A. J. (1996). Models for the 310-helix/coil, π -helix/coil, and α -helix/310-helix/coil transitions in isolated peptides. *Protein science*, 5(8), 1687-1696.
216. Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, 250, 194-199.
217. Sáez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., & Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological reviews*, 83(4), 1359-1400.
218. Sáez, J. C., Nairn, A. C., Czernik, A. J., Fishman, G. I., Spray, D. C., & Hertzberg, E. L. (1997). Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 29(8), 2131-2145.
219. Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H., & Wüthrich, K. (2000). NMR assignment and secondary structure determination of an octameric 110 kDa protein using TROSY in triple resonance experiments. *Journal of the American Chemical Society*, 122(31), 7543-7548.
220. Sánchez-Pedregal, V. M., Reese, M., Meiler, J., Blommers, M. J., Griesinger, C., & Carlomagno, T. (2005). The INPHARMA Method: Protein-Mediated Interligand NOEs for Pharmacophore Mapping. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(27), 4172-4175.

221. Sato, H., Hagiwara, H., Ohde, Y., Senba, H., Virgona, N., & Yano, T. (2007). Regulation of renal cell carcinoma cell proliferation, invasion and metastasis by connexin 32 gene. *Journal of membrane biology*, 216(1), 17-21.
222. Schrödinger, L. L. C. (2010). The PyMOL molecular graphics system, version 1.3 r1. Schrödinger, LLC, Portland, OR.
223. Sewald, N., & Jakubke, H.,-D. (2002). Peptides: Chemistry and Biology. Wiley-VCH, Weinheim. pp. 37-39.
224. Shaw, R. M., Fay, A. J., Puthenveedu, M. A., von Zastrow, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2007). Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell*, 128(3), 547-560.
225. Shen, V., Rifas, L., Kohler, G., & Peck, W. A. (1986). Prostaglandins change cell shape and increase intercellular gap junctions in osteoblasts cultured from rat fetal calvaria. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1(3), 243-249.
226. Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., & Bax, A. (2009). TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *Journal of biomolecular NMR*, 44(4), 213-223.
227. Shi, Y., Hata, A., Lo, R. S., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1997). A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature*, 388(6637), 87-93.
228. Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell*, 94(5), 585-594.
229. Simek, J., Churko, J., Shao, Q., & Laird, D. W. (2009). Cx43 has distinct mobility within plasma-membrane domains, indicative of progressive formation of gap-junction plaques. *Journal of cell science*, 122(4), 554-562.
230. Sirnes, S., Kjenseth, A., Leithe, E., & Rivedal, E. (2009). Interplay between PKC and the MAP kinase pathway in Connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(1), 41-45.
231. Skerrett, I. M., Aronowitz, J., Shin, J. H., Cymes, G., Kasperek, E., Cao, F. L., & Nicholson, B. J. (2002). Identification of amino acid residues lining the pore of a gap junction channel. *The Journal of cell biology*, 159(2), 349-360.
232. Söding, J. (2005). Protein homology detection by HMM–HMM comparison. *Bioinformatics*, 21(7), 951-960.
233. Söhl, G., & Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, 62(2), 228-232.
234. Solan, J. L., & Lampe, P. D. (2008). Connexin43 in LA-25 cells with active v-src is phosphorylated on Y247, Y265, S262, S279/282, and S368 via multiple signaling pathways. *Cell Communication and Adhesion*, 15(1-2), 75-84.

235. Solan, J., & Lampe, P. (2009). Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem. J*, 419, 261-272.
236. Solomatin, S. V., Greenfeld, M., Chu, S., & Herschlag, D. (2010). Multiple native states reveal persistent ruggedness of an RNA folding landscape. *Nature*, 463(7281), 681-684.
237. Sorgen, P. L., Duffy, H. S., Sahoo, P., Coombs, W., Delmar, M., & Spray, D. C. (2004). Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula occludens-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54695-54701.
238. Sosinsky, G. E., & Nicholson, B. J. (2005). Structural organization of gap junction channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711(2), 99-125.
239. Stains, J. P., & Civitelli, R. (2005). Gap junctions regulate extracellular signal-regulated kinase signaling to affect gene transcription. *Molecular biology of the cell*, 16(1), 64-72.
240. Stains, J. P., Lecanda, F., Screen, J., Towler, D. A., & Civitelli, R. (2003). Gap junctional communication modulates gene transcription by altering the recruitment of Sp1 and Sp3 to connexin-response elements in osteoblast promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24377-24387.
241. Thévenin, A. F., Kowal, T. J., Fong, J. T., Kells, R. M., Fisher, C. G., & Falk, M. M. (2013). Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology*, 28(2), 93-116.
242. Thomas, T., Jordan, K., & Laird, D. W. (2001). Role of cytoskeletal elements in the recruitment of Cx43-GFP and Cx26-YFP into gap junctions. *Cell communication and adhesion*, 8(4-6), 231-236.
243. Thomas, T., Jordan, K., Simek, J., Shao, Q., Jedeszko, C., Walton, P., & Laird, D. W. (2005). Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *Journal of cell science*, 118(19), 4451-4462.
244. Thornton, J. M., Todd, A. E., Milburn, D., Borkakoti, N., & Orengo, C. A. (2000). From structure to function: approaches and limitations. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7, 991-994.
245. Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., & Snyder, D. H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *The Journal of cell biology*, 59(2), 267-275.
246. Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., & Snyder, D. H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *The Journal of cell biology*, 59(2), 267-275.
247. Toyofuku, T., Akamatsu, Y., Zhang, H., Kuzuya, T., Tada, M., & Hori, M. (2001). c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1780-1788.

248. Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., & Tada, M. (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 12725-12731.
249. Tran, P. T., Walker, R. A., & Salmon, E. D. (1997). A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends. *The Journal of cell biology*, 138(1), 105-117.
250. Tsukita, S., & Furuse, M. (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?. *Trends in cell biology*, 9(7), 268-273.
251. Tugarinov, V., Choy, W. Y., Orekhov, V. Y., & Kay, L. E. (2005). Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 622-627.
252. Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., & Yeager, M. (1997). Projection structure of a gap junction membrane channel at 7 Å resolution. *Nature structural biology*, 4(1), 39-43.
253. Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., & Yeager, M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science*, 283(5405), 1176-1180.
254. Urschel, S., Höher, T., Schubert, T., Alev, C., Söhl, G., Wörsdörfer, P., Asahara, T., Dermietzel, R., Weiler, R., & Willecke, K. (2006). Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between AII amacrine cells. *Journal of biological chemistry*, 281(44), 33163-33171.
255. Voët, D., & Voët, J. G. (2005). *Biochimie, 2 édition. Édité par De Boeck et Larcier*. ISBN 978-2-8041-4795-2. ième. pp. 219-233.
256. Wagner, S. A., Beli, P., Weinert, B. T., Nielsen, M. L., Cox, J., Mann, M., & Choudhary, C. (2011). A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(10), M111-013284.
257. Warn-Cramer, B. J., & Lau, A. F. (2004). Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1662(1), 81-95.
258. Warn-Cramer, B. J., Cottrell, G. T., Burt, J. M., & Lau, A. F. (1998). Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), 9188-9196.
259. Warn-Cramer, B. J., Lampe, P. D., Kurata, W. E., Kanemitsu, M. Y., Loo, L. W., Eckhart, W., & Lau, A. F. (1996). Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3779-3786.

260. Wayakanon, P., Bhattacharjee, R., Nakahama, K. I., & Morita, I. (2012). The role of the Cx43 C-terminus in GJ plaque formation and internalization. *Biochemical and biophysical research communications*, 420(2), 456-461.
261. Wei, C. J., Francis, R., Xu, X., & Lo, C. W. (2005). Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19925-19936.
262. Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43(5), 647-661.
263. Whitford, D. (2005). *Proteins: structure and function*. John Wiley & Sons. PP 369-372.
264. Wider, G., Macura, S., Kumar, A., Ernst, R. R., & Wüthrich, K. (1984). Homonuclear two-dimensional ¹H NMR of proteins. Experimental procedures. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 56(2), 207-234.
265. Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., & Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological chemistry*, 383(5), 725-737.
266. Williamson, M. P., & Havel, T. F. Wu thrich K (1985) Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J Mol Biol*, 182, 295-315.
267. Wishart, D. S. (2011). Interpreting protein chemical shift data. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 58(1), 62-87.
268. Wishart, D. S., & Case, D. A. (2000). Use of chemical shifts in macromolecular structure determination. *Methods in enzymology*, 338, 3-34.
269. Wishart, D. S., & Sykes, B. D. (1994). Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods in enzymology*, 239, 363-392.
270. Wishart, D. S., & Sykes, B. D. (1994). The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *Journal of biomolecular NMR*, 4(2), 171-180.
271. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., & Sykes, B. D. (1995). ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of biomolecular NMR*, 5(1), 67-81.
272. Wishart, D. S., Sykes, B. D., & Richards, F. M. (1991a). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *Journal of molecular biology*, 222(2), 311-333.
273. Wishart, D. S., Sykes, B. D., & Richards, F. M. (1991b). Simple techniques for the quantification of protein secondary structure by ¹H NMR spectroscopy. *FEBS letters*, 293(1), 72-80.

274. Wishart, D. S., Sykes, B. D., & Richards, F. M. (1992). The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, *31*(6), 1647-1651.
275. Wu, G., Chen, Y. G., Ozdamar, B., Gyuricza, C. A., Chong, P. A., Wrana, J. L., Massagué, J., & Shi, Y. (2000). Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*, *287*(5450), 92-97.
276. Wu, J. W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D. J., Kyin, S., Muir, T. W., Fairman, R., Massague, J., & Shi, Y. (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2: Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF- β signaling. *Molecular cell*, *8*(6), 1277-1289.
277. Wüthrich, K. (1986) NMR of Proteins and Nucleic Acids. John Wiley & Sons. New York NY. Ref Type: Serial (Book,Monograph) pp 17, 118, 127.
278. Wüthrich, K. (2003). NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, *42*(29), 3340-3363.
279. Wüthrich, K., Wider, G., Wagner, G., & Braun, W. (1982). Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance. *Journal of molecular biology*, *155*(3), 311-319.
280. Yang, B., Brown, D., & Verkman, A. S. (1996). The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(9), 4577-4580.
281. Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., & Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *The Journal of cell biology*, *203*(4), 605-614.
282. Yeager, M. (1998). Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *Journal of structural biology*, *121*(2), 231-245.
283. Yeager, M. (2009). Gap junction channel structure. In *Connexins* (pp. 27-75). Humana Press. Yu, X. S., & Jiang, J. X. (2003). Stimulation of lens fiber differentiation by C-terminus of connexin 45.6. *Mol Biol Cell*, *14*, 219a.
284. Zacharias, M. (2005). ATTRACT: protein-protein docking in CAPRI using a reduced protein model. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *60*(2), 252-256.
285. Zhang, Y. W., Kaneda, M., & Morita, I. (2003). The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(45), 44852-44856.
286. Zhou, X. W., Pfahnl, A., Werner, R., Hudder, A., Llanes, A., Luebke, A., & Dahl, G. (1997). Identification of a pore lining segment in gap junction hemichannels. *Biophysical journal*, *72*(5), 1946-1953.

287. Zhou, Y., Yang, W., Lurtz, M. M., Ye, Y., Huang, Y., Lee, H. W., Chen Y., Louis C. F. & Yang, J. J. (2007). Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43. *Journal of biological chemistry*, 282(48), 35005-35017.
288. Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P. J., & Dong, C. (2004). Transforming Growth Factor- β -Induced Inhibition of Myogenesis Is Mediated Through Smad Pathway and Is Modulated by Microtubule Dynamic Stability. *Circulation research*, 94(5), 617-625.
289. Zimmer, D. B., Green, C. R., Evans, W. H., & Gilula, N. B. (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *Journal of Biological Chemistry*, 262(16), 7751-7763.

Résumé

Les connexines constituent une famille de protéines membranaires intégrales qui forment les jonctions communicantes. Ces protéines font partie d'une famille multigénique avec 21 isoformes chez l'homme. La Cx43 est le membre le plus abondant de cette famille et le plus étudié. Tout au long de son cycle de vie, la Cx43 est régulée à travers des modifications post-traductionnelles et/ou par des interactions protéine-protéine qui se produisent essentiellement au niveau de son domaine C-terminal (Cx43CT). Nous avons choisi d'étudier l'interaction de la tubuline et des microtubules avec un peptide (K26D) correspondant à la région juxta-membranaire (K234-D259) du domaine Cx43CT par RMN. Nos résultats ont démontré que la région juxta-membranaire de la Cx43 interagit directement et spécifiquement avec la tubuline et les microtubules et adopte lors de sa liaison à la tubuline une structure compacte hélicoïdale. En outre, nos travaux ont montré que cette interaction implique au moins deux groupes de résidus ²³⁹RV²⁴⁰ et ²⁴⁷YHAT²⁵⁰ du Cx43CT qui se trouvent à proximité immédiate de ces partenaires. Le résidu Y247, situé au sein d'un site de phosphorylation par la protéine kinase *v-Src* est impliqué dans l'interaction de la région juxta-membranaire de la Cx43 avec la tubuline et les microtubules. Pour cela, nous avons tenté d'étudier l'influence de la phosphorylation du résidu Y247 sur cette liaison. Nos résultats ont montré que cette interaction est négativement régulée par cette phosphorylation. Enfin, pour progresser dans la compréhension de la compétition entre la protéine Smad2 et la Cx43 pour leur liaison au système tubuline/microtubules. Nous avons étudié la compétition entre le peptide K26D et un autre peptide issu du domaine MH2 de la protéine Smad2 pour leur liaison à la tubuline. Nous avons démontré que la région M416-T434 du domaine MH2 incluse dans le peptide issu de la protéine Smad2 participe à sa liaison à la tubuline. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de compétition entre les peptides issus de Cx43 et de Smad2 pour leur interaction avec la tubuline. L'ensemble des résultats sont discutés en fonction de l'état de l'art et de la littérature.

Mots clés: Connexine43, tubuline, microtubules, Smad2, phosphorylation, RMN.

Abstract

The connexins constitute a family of integral membrane proteins that form gap junctions. In humans, the connexins belong to a multigene family of 21 isoforms. Cx43 is the most abundant and studied member of this family. During its life cycle, Cx43 is regulated by post-translational modifications and/or protein-protein interactions that occur primarily in its C-terminal domain (Cx43CT). We chose to study the interaction of tubulin and microtubules with a peptide (K26D) corresponding to the juxtamembrane region (K234-D259) of the Cx43CT domain by NMR spectroscopy. We demonstrated that the juxtamembrane region of Cx43 interacts directly and specifically with tubulin and microtubules and adopt upon binding to tubulin a compact helical structure. In addition, our results showed that this interaction involves at least two clusters of residues ²³⁹RV²⁴⁰ and ²⁴⁷YHAT²⁵⁰ of Cx43CT which are in close proximity of these partners during interaction. The Y247 residue, located within a phosphorylation site by the protein kinase *v-Src* is involved in the interaction of the juxtamembrane region of the Cx43 with tubulin and microtubules. For this reason, we tried to study the influence of phosphorylation of the Y247 residue on this binding. Our results have shown that this interaction is negatively regulated by this phosphorylation. Finally, in order to progress in the understanding of the competition between Smad2 protein and Cx43 for their binding to the tubulin/microtubules system, we probed the putative competition between the K26D peptide and another one from the MH2 domain of Smad2 protein for their binding to tubulin. We succeeded showing that the binding of the Smad2 peptide to tubulin involves the M416-T434 region of its MH2 domain. However, we did not note evidence a competition between the peptides derived from Cx43 and Smad2. The results are discussed in regards to the state of the art and of the current literature.

Key words : Connexin43, tubulin, microtubules, Smad2, phosphorylation, NMR.

ملخص

الكونكسين عائلة من البروتينات التي تشكل موصلاً فجوي يربط بين خليتين متجاورتين. تنتمي الكونكسين إلى عائلة متعددة الجينات (21 عضو). الكونكسين 43 (Cx43) هو العضو الأكثر وفرة ودراسة من هذه العائلة. خلال دورة حياتها، تنظم الكونكسين 43 عن طريق التعديلات ما بعد الترجمة و/أو تأثير بروتين - بروتين. هذه التغييرات تحدث أساساً في مجال النهاية المطرفية الكربونية (Cx43CT) الخاص بها. في هذه الدراسة اخترنا تأثير بين الأنابيب الدقيقة والبروتين المكون لها (توبولين) مع الببتيد (K26D) المقابل للمنطقة القريبة من الغشاء الخلوي (D259-K234) المتواجدة في المجال Cx43CT وهذا بواسطة الرنين النووي المغناطيسي. أثبتنا أن المنطقة المحصورة ما بين الأحماض الأمينية الليزين K234 وحمض الأسبرتيك D259 لمجال النهاية المطرفية الكربونية للكونكسين 43 ترتبط مباشرة وتحديداً مع التوبولين والأنابيب الدقيقة أين تتأثر بتغييرات تشكيلية لتكتسب بنية حلزونية. بالإضافة إلى ذلك أظهرت نتائجنا أن هذا الارتباط يشمل مجموعتين على الأقل من مواقع الارتباط هما ²⁴⁰VR²³⁹ و ²⁵⁰TAHY²⁴⁷ من المجال Cx43CT. يشمل موقع الارتباط بين المنطقة (D259-K234) من Cx43CT مع توبولين والأنابيب الدقيقة على الحمض الأميني تيروزين Y247 المتواجد ضمن موقع الفسفرة للإنزيم كيناز *v-Src*. لهذا السبب، حاولنا دراسة تأثير فسفرة الحمض الأميني Y247 على هذا الارتباط. أظهرت نتائجنا أن الفسفرة تنظم سلباً هذا الارتباط. أخيراً من أجل إحراز تقدم في فهم المنافسة المفترضة بين البروتين سمد2 و الكونكسين 43 للارتباط بتوبولين والأنابيب الدقيقة قمنا بإجراء المنافسة بين الببتيد K26D وببتيد اخر مستمد من المجال MH2 للبروتين سمد2 للارتباط بالتوبولين. أظهرت نتائجنا ان الببتيد المقابل للمنطقة M416-T434 للبروتين سمد2 يرتبط بتوبولين. ولكن لم نتحصل على أدلة تظهر لنا التنافس بين الببتيدات المشتقة من البروتينات الكونكسين 43 وسمد2.

الكلمات المفتاحية: الكونكسين 43, التوبولين, الأنابيب الدقيقة, سمد2, الفسفرة, الرنين النووي المغناطيسي.