

Intitulé du Sujet de Thèse : Approches modernes pour l'étude de la dynamique de la cytochrome P450 reductase par RPE

Laboratoire : Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, BIP-UMR7281

Equipe : Biophysique des métalloprotéines

Directeur de thèse : Marlène Martinho, MCF, HDR

email : marlene.martinho@univ-amu.fr

Contexte de l'étude. L'obtention de données structurales précises et pertinentes sur les protéines est une étape importante pour la compréhension des mécanismes chimiques impliqués dans les fonctions biologiques ; c'est donc d'un intérêt crucial pour des applications pharmaceutiques et biotechnologiques. Les protéines sont des entités dynamiques ayant une flexibilité inhérente, une propriété fondamentale qui leur permet d'interagir avec d'autres molécules (substrats, cofacteurs ou protéines). Par conséquent, les modifications structurales et/ou les mouvements de domaines doivent être obtenus sous des conditions fonctionnelles. En particulier, dans le cas des protéines redox, il est important d'étudier l'impact de la dynamique de domaines sur le transfert d'électron (TE). Le projet de thèse porte sur l'étude d'une flavoprotéine, la cytochrome P450 reductase (CPR). La CPR est une protéine membranaire redox située du côté cytoplasmique du réticulum endoplasmique. Elle transfère les électrons de NADPH vers des accepteurs dont les cytochromes P450 (CYP) et a un rôle majeur dans des processus biologiques comme les métabolismes des stéroïdes ou d'acides gras.¹ Elle contient deux domaines de fixation du FAD et du FMN et une région flexible reliant les deux domaines précédents.² La CPR transfère les électrons (TE) du NADPH (transfert d'hydrure) vers des protéines partenaires hémiques via les sites flaviniques. Afin que le TE inter-flavines soit possible, les deux domaines FAD et FMN doivent être proches (conformation "fermée" de la CPR), mais le TE inter-protéine (FMN vers les CYPs : pas défini) requiert une conformation plus "ouverte" de la CPR permettant un rapprochement de ces deux domaines. Ce modèle binaire (conformations "fermée" vs. "ouverte"), basé sur des études cristallographiques et des études *in silico*, est cependant un peu simpliste. Plusieurs techniques biophysiques tendent à montrer qu'en solution, la CPR existe sous forme d'un continuum de populations.²

Descriptif du projet

Ce projet de thèse porte sur l'étude de la relation entre les mouvements de domaines et l'activité de la CPR via le TE. Les études seront faites en utilisant la technique de marquage de spin couplé à la RPE.^{3, 4} Pour cela, une ou plusieurs sondes paramagnétiques (nitroxydes) seront introduites en des positions choisies de la protéine. Classiquement, ces sondes sont spécifiques des cystéines. Les cystéines de la CPR étant impliquées dans l'activité enzymatique, elles ne peuvent être modifiées. L'incorporation d'acides aminés non naturels (aann) et leur marquage par des nitroxydes spécifiques s'est révélée être une alternative puissante.⁵ Il est également possible d'incorporer deux aann sur la même protéine afin de mesurer des distances entre centres paramagnétiques. Ces approches utilisant l'incorporation des aann contenant un groupe chimique réactif pour introduire des sondes biophysiques (fluorescences, RMN ou RPE), via des réactions de conjugaison bioorthogonale, de "click chemistry" ou de photo activation, se sont beaucoup développées ces dernières années.⁶⁻¹⁰ Lors de cette thèse, nous incorporerons plusieurs aann en 1 ou deux positions sur la CPR. Des mesures de distances entre deux sondes paramagnétiques seront réalisées par RPE impulsionnelle. Nous tirerons également profit de la présence de centres flaviniques préparés dans des états redox paramagnétiques (semi-quinones) comme sondes endogènes pour les mesures de distances. Les protocoles de purification, les expériences de marquage et les rendements seront à optimiser. Les mouvements de domaines en lien avec le TE sera étudié, notamment en présence du partenaire physiologique de la CPR.

Ce projet interdisciplinaire, réalisé en collaboration avec Gilles Truan à Toulouse, fait appel à des études et compétences complémentaires entre la chimie, la biochimie et la spectroscopie RPE. Il s'appuiera sur les équipements de la plateforme RPE d'Aix-Marseille disponibles au laboratoire BIP, ainsi que sur la plateforme de production de protéine & criblage en collaboration avec Déborah Byrne. Le(la) candidat(e) devra avoir validé un master de chimie, avec de préférence un parcours à l'interface chimie/biologie. Il (elle) devra avoir de l'intérêt pour les sujets à l'interface chimie/biologie et pour la spectroscopie, être motivé(e) et dynamique, et être capable de travailler dans une équipe interdisciplinaire. Les dossiers de candidatures doivent contenir un CV, les relevés de notes de licence et master, une lettre de motivation et une lettre de recommandation. Ils doivent être envoyés par email à marlene.martinho@univ-amu.fr au plus tard le 18 mai.

Références Bibliographiques

1. D. S. Riddick, X. Ding, C. R. Wolf, T. D. Porter, A. V. Pandey, Q. Y. Zhang, J. Gu, R. D. Finn, S. Ronseaux, L. A. McLaughlin, C. J. Henderson, L. Zou and C. E. Fluck, *Drug Metab Dispos*, 2013, **41**, 12-23.
2. T. M. Hedison and N. S. Scrutton, *FEBS J*, 2019, **286**, 2004-2017.
3. M. Martinho, E. Fournier, N. Le Breton, E. Mileo and V. Belle, in *Electron Paramagnetic Resonance: Volume 26*, The Royal Society of Chemistry, 2019, vol. 26, pp. 66-88.
4. N. Le Breton, M. Martinho, K. Kabytaev, J. Topin, E. Mileo, D. Blocquel, J. Habchi, S. Longhi, A. Rockenbauer, J. Golebiowski, B. Guigliarelli, S. R. A. Marque and V. Belle, *Phys.Chem. Chem.Phys.*, 2014, **16**, 4202-4209.
5. T. Braun, M. Drescher and D. Summerer, *Int J Mol Sci*, 2019, **20**.
6. Y. Zhang, K. Y. Park, K. F. Suazo and M. D. Distefano, *Chem Soc Rev*, 2018, **47**, 9106-9136.
7. C. C. Liu and P. G. Schultz, *Annu Rev Biochem*, 2010, **79**, 413-444.
8. K. Lang and J. W. Chin, *ACS Chem Biol*, 2014, **9**, 16-20.
9. F. Wang, S. Robbins, J. Guo, W. Shen and P. G. Schultz, *PLoS One*, 2010, **5**, e9354.
10. L. Wang, A. Brock, B. Herberich and P. G. Schultz, *Science*, 2001, **292**, 498-500.