



HAL
open science

Une histoire de couleur ou de lumière, 20 ans de pratique expérimentale.

Jérôme Dupuy

► **To cite this version:**

Jérôme Dupuy. Une histoire de couleur ou de lumière, 20 ans de pratique expérimentale.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Grenoble - Alpes, 2024. tel-04918471

HAL Id: tel-04918471

<https://hal.science/tel-04918471v1>

Submitted on 29 Jan 2025

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

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

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Présentée par

Jérôme DUPUY

Ecole doctorale : Chimie & Sciences du vivant (ED 218)

Discipline : Biologie

Une histoire de couleur ou de lumière, 20 ans de pratique expérimentale.

Soutenue le 5 juillet 2024 devant le jury composé de

Pierre-Damien COUREUX

Rapporteur

Marie ERARD

Rapporteuse

David PIGNOL

Rapporteur

Ludovic PELOSI

Examineur

Robertus RUIGROK

Examineur

Antoine ROYANT

Examineur

*HDR préparée à
Institut de Biologie Structurale
Campus EPN
71 Av. des Martyrs
38000 Grenoble*



TABLE DES MATIERES

Table des matières	2
Remerciements	3
Préambule	4
<i>Curriculum vitae</i>	5
Partie 1 : De Grenoble à San Diego	12
Travaux de thèse - IBS / LCCP	13
Introduction	13
Le projet	17
Résultats et discussion	17
Conclusion personnelle	22
Travaux de post-doctorat – TSRI / Stevens Lab	24
Introduction	24
Le projet	25
Résultats et discussion	26
Conclusion personnelle	29
Partie 2 : De l’UJF à l’UGA	30
Mon recrutement à l’Université Joseph Fourier	31
Introduction	31
Le projet	35
Résultats et discussion	35
Conclusion personnelle	41
Le groupe Synchrotron	42
Introduction	42
Les projets	46
Conclusion provisoire	52
Notes supplémentaires	53
Bibliographie	54

REMERCIEMENTS

Il est d'usage de commencer son manuscrit par des remerciements. J'avais trouvé cet exercice étrange alors que je rédigeais ma thèse aussi, j'avais repoussé cela à plus tard, me disant que j'aurais tout le loisir de le faire une fois mes objectifs atteints. Il va de soi que j'aurais remercié les gens de mon laboratoire à commencer par mon directeur de thèse Juan-Carlos Fontecilla Camps et mon co-directeur Anne Volbeda, car sans eux, je ne serais pas aujourd'hui docteur. Cela aurait été surtout l'occasion de remercier les personnes qui m'ont donné la force de venir au laboratoire les jours de doute et il y en a eu. Sauf que voilà, j'ai trop attendu et j'ai perdu l'une d'elles. Lilian nous a quittés trop tôt. Je ne ferai pas deux fois la même erreur aussi, merci, Carlos et Mickaël pour ces années au LCCP et pour tout ce que nous vivons ensemble depuis. A l'image de Gaston Statler et Victor Waldorf dans le Muppet Show, nous refaisons incessamment le monde en pestant qu'avant c'était mieux... enfin avec Mick, vous râlez quand même plus que moi !

Loin des standards habituels, je souhaite aussi remercier mon jury. C'est généralement plus un exercice de style que quelque chose de sincère, mais je vais faire différemment.

Rob, tu as été le président de mon jury de recrutement et c'était important pour moi que tu sois celui de mon HDR. Ludovic, tu étais aussi là ce jeudi 19 mai 2011. Je sais que tu avais su apprécier les « subtilités » de mon CV. Rob et Ludovic, j'espère que vous ne regrettez pas la confiance que vous m'avez accordée. Merci pour cela et pour votre présence aujourd'hui.

David, je suis arrivé au LCCP, tu étais déjà ailleurs. Je n'oublie pas ta disponibilité et tes conseils quand, depuis San Diego chez Jean-Luc, tu as écouté patiemment et en visio ma présentation en vue de mon interview devant l'équipe de Ray C. Stevens au Scripps. Merci, car j'y ai passé une période magique de ma vie.

Pierre-Damien, des cours HERCULES, en passant par les jardins de Saint-Quentin-Sur-Isère ou encore le Poséidon Restaurant à Del Mar, je crois que nous avons souvent refait le monde. Merci pour ton humour subtil et ta finesse d'esprit.

Marie, vous avez travaillé sur les NADPH oxydases et maintenant sur les protéines fluorescentes, sans volonté de ma part de vous singer, je suis vos pas et je les espère aussi fructueux. Merci pour votre présence.

Antoine, nous nous sommes réellement connus à San Diego et depuis j'ai pu apprécier toute l'étendue de ton amitié. Merci.

Enfin, il est normal que je pense à mes proches. Mes parents, Camille et Joël, qui se sont souvent demandé en quoi consistaient mes études et maintenant mon métier, mais qui m'ont encouragé malgré tout. Ma sœur Stéphanie, avec qui j'ai passé beaucoup d'examens et surtout les siens ces dernières années. Je suis fier de ma grande sœur. A Sophie, ma compagne, qui me supporte depuis San Diego et avec qui je construis mes choix et ma vie. Nous ne sommes pas toujours d'accord, mais il paraît que j'ai besoin de contradicteurs. A Elise, notre fille, qui donne un sens à énormément de choses et qui me fait très souvent toucher du doigt le fait que je ne peux pas tout maîtriser.

PREAMBULE

Par ce manuscrit, je souhaite résumer le parcours qui a été le mien en recherche depuis maintenant un peu plus de 23 ans. A défaut d'être exhaustif, car je ne parlerai pas de mon parcours universitaire à Montpellier, de ce qui a forgé mon envie de devenir scientifique ni de mon retour en France à proprement parler, je me propose de découper ce quasi-quart de siècle en deux étapes. La première parlera de mon doctorat et de mon séjour en Californie. Je ferai ensuite un bond jusqu'à mon recrutement, ce qui me permettra d'enchaîner avec la deuxième partie avant de terminer par mon changement d'équipe et de thématique.

L'exercice qui m'est demandé ici est néanmoins frustrant, car, si je suis chercheur, je suis aussi enseignant. A l'instar de mes collègues « chercheurs » mon travail ne se résume pas qu'à la Science. J'ai choisi ce métier d'enseignant-chercheur et je ne m'imagine pas autrement. Je sais que l'exercice du moment, l'examen pour savoir si j'ai les qualités requises pour être Habilité à Diriger des Recherches, n'a cure de ce que je fais en tant qu'enseignement, mais je ne pourrai pas m'empêcher, à la toute fin de ce document, d'en parler succinctement.

Je souhaite ce document simple et rapide à lire, mais tout de même complet. Il doit vous permettre de cerner ce que j'ai fait et ce que je veux faire tout en vous permettant d'anticiper vos questions pour le jour de la présentation.

Bonne lecture

Curriculum vitae



DUPUY Jérôme

Né le 07/11/1976

A Béziers (34) - FRANCE

Adresse professionnelle
Institut de Biologie Structurale
Campus EPN, CS 10090
71 Avenue des Martyrs
38044 Grenoble Cedex 9 - FR
Tél : (+33) (0)4 57 42 86 26
Email : jerome.dupuy@ibs.fr

POSITION ACTUELLE

Depuis 2011, Maître de Conférences (MCF) à l'Université Grenoble Alpes (UGA), promu hors classe au niveau national en 2021.

FORMATION

Université Joseph Fourier devenu depuis UGA, GRENOBLE

2005: Doctorat au Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenese des Proteines (LCCP), Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UGA.

Directeur de thèse : Juan C. FONTECILLA-CAMPS.

Date de soutenance : 31 mai 2005.

Université des Sciences et Technologie du Languedoc (UM II), MONTPELLIER

2000-2001: Diplôme d'Etude Approfondie (DEA) « Biologie Santé », mention AB ;

1999-2000: Maîtrise de « Biochimie Cellulaire et Moléculaire », mention B ;

1998-1999: Licence de « Biochimie, Chimie et Physiologie », mention AB ;

1996-1998: Diplôme d'Etudes Univesitaires Générales (DEUG) de Science de la Vie, mention AB.

PARCOURS EN RECHERCHE

23 ans de pratique expérimentale dans 9 équipes différentes avec une mobilité aussi bien nationale qu'internationale.

Depuis décembre 2017 : MCF au sein du groupe Synchrotron - équipe icOS (in crystallo Optical Spectroscopy) à l'IBS, GRENOBLE. Responsable : Antoine ROYANT (DR CNRS). Sujet : « Compréhension structurale de l'efficacité de la fluorescence dans les protéines fluorescentes » ;

Septembre 2011 – Décembre 2017 : MCF au sein du groupe Membrane et Pathogène - équipe MIT (Membrane and Immunity Team) à l'IBS, GRENOBLE. Responsable : Franck FIESCHI (Pr UGA). Sujet : « La famille des NADPH oxidases, une nouvelle cible procaryote » ;

Janvier 2010 - Décembre 2021 : officier dans la Réserve Opérationnelle au sein de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) rattaché au Service de Santé des Armées, BRETIGNY-SUR-ORGES. Responsable : Florian NACHON. Sujet : « Expression et purification de la paraoxonase humaine en bactérie, drosophile et CHO » ;

Octobre 2008 - Décembre 2010 : post-doctorant dans le groupe Pathogénicité Bactérienne à l'IBS, GRENOBLE. Responsable : Andrea DESSEN. Sujet : « Etudes structurales d'un nouveau complexe de PBP chez E. coli, PBP1a et PBP2 » ;

Mars 2006 - Août 2008 : post-doctorant au « The Scripps Research Institute » (TSRI), LA JOLLA, USA. Responsable : Raymond STEVENS. Sujet : « Structural studies of the Botulinum neurotoxin subtype A in order to improve knowledge on a famous tool in the treatment of neuromuscular disorders and cosmetic corrections » ;

Juin - Décembre 2005 : post-doctorant sur la ligne de lumière FIP (French beamline for Investigation of Proteins) à l'IBS, GRENOBLE. Responsable : Jean-Luc FERRER and

Lilian JACQUAMET. Sujet : « *Expression et purification de la cycline D1 et de cdk6 dans la levure P. pastoris afin de former un complexe ternaire cycline D1-Cdk6-p21* » ;

Octobre 2001 - Mai 2005 : doctorant dans le Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines (LCCP) à l'IBS, GRENOBLE. Responsable : Juan C. FONTECILLA-CAMPS. Sujet : « *Etudes cristallographiques de la protéine IRP1 (Iron Regulatory Protein 1), un régulateur humain de l'homéostasie du fer* ».

RESPONSABILITES COLLECTIVES

Depuis le 29 avril 2024 : membre de droit du bureau et du conseil de la Faculté des Sciences (FdS) au titre de directeur de composante élémentaire de la CSPM FdS. Membre de droit du Conseil des Directeurs de Composantes de l'UGA ;

Depuis le 13 mars 2024 : élu directeur du « Département de la Licence sciences et technologies » (DLST) à l'UGA (prise de fonction le 29 avril 2024). Le DLST c'est 2700 étudiants, 27 personnels BIATSS et environ 52 000 heures de cours par an ;

Depuis septembre 2021 : créateur et responsable de l'UE de L3 « Biophysique des protéines fluorescentes » (BIO 666) à l'UGA. BIO 666 est une UE expérimentale de 27 heures dispensées par 4 enseignants auprès de plus de 90 étudiants ;

Depuis décembre 2019 : membre élu et réélu (en 2023) à la section 64 « biochimie, biologie moléculaire » du Conseil National des Universités. La CNU 64 siège plusieurs fois par an afin de qualifier les candidats aux postes d'enseignant-chercheur, de décider au niveau national des avancements de grade, d'attribuer des congés pour recherches ou conversions thématiques (CRCT) ou certaines primes individuelles ;

Depuis avril 2017 : responsable du « Secteur Pédagogique - Science, Technologie et Médecine » de la maison d'édition de l'UGA. UGA Editions est la 2^{ème} maison d'édition universitaire de France ;

2019 - 2024 : directeur-adjoint du « Département de la Licence sciences et technologies » (DLST) ;

2019 - 2024 : chargé de mission handicap au sein du DLST. La cellule des Etudiants à Besoins Spécifiques gèrent plus de 200 dossiers annuellement et est constituée de 2 personnels BIATS ;

2018 - 2024 : co-responsable de l'UE de L1 « Les constituants biomoléculaires de la cellule » (BIO 101 & 131) à l'UGA. BIO 101 & 131, c'est plus de 550 étudiants dont 60 en filière internationale, 32 enseignants et 1 100 heures d'enseignement ;

2016 - 2021 : créateur et responsable de l'UE de M2 « Entrepreneurship and Sciences » à l'UGA. UE obligatoire pour tous les M2 mention Biologie de l'UFR de Chimie et Biologie soit plus de 70 étudiants qui suivaient 24 heures d'enseignement dispensé par au minimum 2 professionnels. Cette UE professionnalisante est toujours dans l'offre de formation de la nouvelle maquette de l'UGA ;

2012 - 2017 : responsable de l'UE de M2 « Biologie à Haut Débit » à l'UGA. Cette UE était optionnelle pour l'ensemble des étudiants de l'UFR de Chimie et Biologie. Chaque année environ une vingtaine d'étudiants suivait 40 heures de conférences dispensées par 12 intervenants. Cette UE est toujours dans l'offre de formation de la nouvelle maquette de l'UGA.

MANAGEMENT ET SUPERVISION DE COLLABORATEURS

Gestion de 26 collaborateurs directement sous ma supervision dont 1 post-doctorant, 3 ingénieurs, 2 thèses à 50%, 4 M2 et 8 M1 ;

** encadrement ayant conduit à la publication d'au moins un article ;*

‡ encadrement ayant conduit à la publication d'un brevet.

Depuis octobre 2023 : supervision de E. ORGEL en tant qu'assistante ingénieure financée par l'ANR « InfraredFP800 » ;

Depuis octobre 2022 : co-encadrement de la thèse de M. CHORFA (ED CSV - bourse Labex Gral) ;

Depuis septembre 2022 : supervision de C. BERGONZI en tant que ATER (UGA) ;

Mai 2023, Septembre - Octobre 2023 : encadrement de M. GUISSOUMA étudiante en BTS (Lycée Louise Michel) ;

Avril - Août 2023 : encadrement de I. BOUKHERROUBA étudiant de M1 (UGA) ;

Juin - Juillet 2022 : encadrement de L. COURTY étudiante de M1 (Université Clermont Auvergne) ;

Avril - Mai 2022 : encadrement de B. MICHEL étudiant de M1 (Aix Marseille Université) ;

Mai - Décembre 2020 : supervision de S. AUMONIER en tant qu'ingénieur de recherche financé par l'ANR « BANDIT » ;

* **Janvier – Décembre 2019** : encadrement de K. DUARTE étudiant de M2 (UGA) de janvier à juin puis en tant qu'ingénieur d'étude de juillet à décembre financé par l'ANR « BANDIT » ;

Avril - Juillet 2018 : encadrement de K. DUARTE étudiant de M1 (UGA) ;

Février 2018 - Septembre 2019 : supervision de J. BZDRENGA post-doctorant financé par l'ANR « BANDIT » ;

Juin - Juillet 2017: encadrement de K. DUARTE étudiant de L3 (UGA) ;

Décembre 2016 - Décembre 2017 : supervision de J. BZDRENGA post-doctorant financé par le programme « Technologie pour la Santé du CEA » ;

Octobre 2015 - Mai 2016 : supervision de P. GABARD en tant qu'ingénieur d'étude financé par le programme « GRAL-VALO call 2 » ;

* **Février - Juin 2015** : encadrement de G. DIAS MIRANDELA étudiant de M2 (UGA) ;

*‡ **Septembre 2011 – Novembre 2014** : co-encadrement de la thèse de C. HAJJAR (ED CSV - bourse MENRT), thèse soutenue le 21/11/2014 ;

Avril - Juillet 2014 : encadrement de G. DIAS MIRANDELA étudiant de M1 (UGA) ;

Juin - Juillet 2014 : encadrement de P. BUFFARD étudiante de L1 (UGA) ;

Février - Juin 2013 : encadrement de B. LAFUMAT étudiante de M2 (UGA) ;

Juin - Juillet 2012 : encadrement de J.B. BONNIER étudiant de L1 (UGA) ;

Avril - Juin 2012 : encadrement de N. GOSSET étudiante de M1 (UGA) ;

Juin - Octobre 2010 : encadrement de C. AUTISSIER étudiante en BTS (Lycée Louise Michel) ;

Juin - Août 2010 : encadrement de C. MASSON étudiant de L3 (UGA) ;

Janvier - Juin 2010 : encadrement de A. SMAALI étudiant en M2 (UGA) ;

Février - Juin 2008 : encadrement de A. KAUR étudiante en Master degree (The Scripps Research Institute) ;

Juin - Septembre 2005 : encadrement de E. BECHET élève ingénieure (CPE Lyon) ;

Juillet - Novembre 2003 : encadrement de N. PERRIN élève ingénieure (ESIEE Paris) ;

Juin - Juillet 2003 : encadrement de D. TRAORE étudiant de L3 (UGA) ;

Mars - Mai 2003 : encadrement de O. HADDAD étudiant de M1 (UGA) ;

Février - Juin 2001 : encadrement de U.G. ULUCAY étudiante de M1 (Université Montpellier 2).

COMPLEMENTS

2014 : membre du comité d'organisation du GTBio 2014 (Association Française de Cristallographie Groupe Thématique Biologie) ;

2012 : expert pour l'évaluation des projets ASTRID de l'ANR et tout particulièrement ceux ayant un lien avec les agents bactériologiques comme la toxine botulique.

FINANCEMENTS

624 k€ en 12 ans de carrière universitaire.

2022 : porteur du projet EUR/IDEX de jouvence des systèmes de purification de protéines des TP de Biochimie (L2, L3 et M1 soit plus de 800 étudiants) - 80 k€

Janvier 2018 - Juillet 2021 : coordinateur de l'ANR BANDIT #ANR-17-CE11-0013 - 397 k€ ;

Décembre 2016 - Décembre 2017 : programme "Technologie pour la Santé" du CEA Call 2016 - 70 k€ ;

Octobre 2015 - Mai 2016 : financement Valo-GRAL Call 2 2015 - 35 k€ ;

2014 : financement Valo-GRAL 2014 - 15 k€ ;

2014 : financement Vice-Présidence Recherche-Valorisation de l'UJF - 12 k€ ;

2013 : Appel à projet Grenoble Innovation Recherche (AGIR) de l'UJF - 15 k€.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

21 publications toutes référencées au JCR avec un H-index de 16 et plus de 1200 citations ;

2 brevets internationaux ;

1 chapitre de livre ;

Lien vers mon ORCID : [ici](#)

Premier ou co-premier auteur : 3 () – Dernier auteur et/ou auteur correspondant : 1 (‡).*

Livre

- 1 "Cytosolic aconitase". A. Volbeda, J.M. Moulis, J. Dupuy, W. Walden, K. Volz and J.C. Fontecilla-Camps in *Handbook of Metalloproteins*, A. Messerschmidt, R Huber, T Poulos, K Wieghardt, Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2007 online.

Brevets

- ‡2 "*Protéines NADPH oxydases*". Inventors: J. Dupuy, C. Hajjar, F. Fieschi, B. Lafumat, M.V. Cherrier. WO/2015/162383 - PCT/FR2015/051101, (2015). Applicant : Université Joseph Fourier – Université Grenoble Alpes.
- 1 "*A novel subtype of clostridium botulinum neurotoxin type A and uses thereof*". Inventors: E.A. Johnson, M.J. Jacobson, G. Lin, R.C. Stevens, J. Dupuy, P. Stenmark and W.H. Tepp. Publication number WO/2010/127258, Application number PCT/US2010/033188 (2010).

Publications

- 21 « *X-ray structure and enzymatic study of a bacterial NADPH oxidase highlight the activation mechanism of eukaryotic NOX.* » I. Petit-Hartlein, A. Vermot, M. Thépaut, A.S. Humm, F. Dupeux, J. Dupuy, V. Chaptal, J.A. Marquez, S.M.E. Smith, F.Fieschi. **Elife** (2024), Apr 19;13:RP93759.
- 20 « *mScarlet3: a brilliant and fast-maturing red fluorescent protein.* » TWJ. Gadella Jr., L. van Weeren, J. Stouthamer, MA. Hink, AHG. Wolters, BNG. Giepmans, S. Aumonier, J. Dupuy, A. Royant. **Nature Methods** (2023), 10.1038/s41592-023-01809-y.
- 19 « *Cyan fluorescent proteins derived from mNeonGreen.* » L. Zarowny, D. Clavel, R. Johansson, K. Duarte, H. Depernet, J. Dupuy, H. Baker, A. Brown, A. Royant, RE. Campbell. **Protein Eng Des Sel** (2022), Feb 17;35:gzac004.
- 18 « *Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins.* » C. Breyton, W. Javed, A. Vermot, C.A. Arnaud, C. Hajjar, J. Dupuy, I. Petit-Hartlein, A. Le Roy, A. Martel, M. Thépaut, C. Orelle, J.M. Jault, F. Fieschi, L. Porcar, C. Ebel. **Biochim Biophys Acta Biomembr** (2019), 1861(5):939-957.

- #17 « *The NOX family of proteins is also present in bacteria.* » C. Hajjar, M.V. Cherrier, G. Dias Mirandela, I. Petit-Hartlein, M.J. Stasia, J.C. Fontecilla-Camps, F. Fieschi, J. Dupuy. **MBio** (2017), Nov 7; 8(6).
- 16 « *A two-component NOX-like system in bacteria is involved in the electron transfer chain to the methionine sulfoxide reductase MsrP.* » C. Juillan-Binard, A. Picciocchi, J.P. Andrieu, J. Dupuy, I. Petit-Hartlein, C. Caux-Thang, C. Vivès, V. Nivière, F.J. Fieschi. **Journal of Biological Chemistry** (2016), 292(6), 2485-2494.
- 15 « *Identification of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) as a protein receptor for botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A).* » B.P.S. Jacky, P.E. Garay, J. Dupuy, J.B. Nelson, B. Cai, Y. Molina, L.E. Steward, R.S. Broide, J. Francis, K.R. Aoki, R.C. Stevens, E. Fernández-Salas. **PLoS pathogens** (2013), 9(5), e1003369.
- 14 « *Purification, Modeling and Analysis of Neurotoxin BoNT/A5 from Clostridium botulinum Strain A661222* ». M.J. Jacobson, G. Lin, W. Tepp, J. Dupuy, P. Stenmark, R.C. Stevens and E.A. Johnson. **Applied and environmental microbiology** (2011), 77(12), 4217-22.
- 13 « *Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding* ». P. Stenmark, M. Dong, J. Dupuy, E.R. Chapman and R.C. Stevens. **Journal of Molecular Biology** (2010), 397(5), 1287-1297.
- 12 « *Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus* ». D.V. Pompea, M. Elias, L. Merone, G. Graziano, J. Dupuy, L. Mandrich, P. Carullo, B. Fournier, D. Rochu, M. Rossi, P. Masson, E. Chabriere and G. Manco. **Extremophiles** (2009), 13(3), 461-470.
- *11 « *Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction* ». P. Stenmark, J. Dupuy, A. Imamura, M. Kiso and R.C. Stevens. **PLoS pathogens** (2008), 4(8), e1000129.
- 10 « *Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities* ». M. Elias, J. Dupuy, L. Merone, L. Mandrich, E. Porzio, S. Moniot; D. Rochu; C. Lecomte; M. Rossi; P. Masson, G. Manco and E. Chabriere. **Journal of Molecular Biology** (2008), 379, 1017-1028.
- 9 « *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the hyperthermophilic Sulfolobus solfataricus phosphotriesterase* ». M. Elias, J. Dupuy, L. Merone, C. Lecomte, M. Rossi, P. Masson, G. Manco and E. Chabriere. **Acta. Cryst.** (2007), F63, 553-555.
- 8 « *Decouverte et structure cristallographique d'une apolipoprotéine humaine* ». R. Morales, A. Berna, P. Carpentier, C. Contreras-Martel, F. Renault, M. Nicodeme, M.L. Chesne-Seck, F. Bernier, J. Dupuy, C. Schaeffer, H. Diemer, A. Van-Dorsselaer, J.C. Fontecilla-Camps, P. Masson, D. Rochu and E. Chabriere. **Ann. Pharm. Fr.** (2007), 65, 98-107.
- 7 « *Structural basis for the modulation of CDK-dependent/independent activity of cyclin DI* ». J.L. Ferrer, J. Dupuy, F. Borel, L. Jacquamet, J.P. Noël and V. Dulic. **Cell Cycle** (2006), 5(23), 2760-2768.
- 6 « *Structure of dual function Iron Regulatory Protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA* ». W.E. Walden, A.I. Selezneva, J. Dupuy, A. Volbeda, J.C. Fontecilla-Camps, E.C. Theil and K. Volz. **Science** (2006), 314(5807), 1903-1908.
- 5 « *Structural characterization of the conformational changes of E. coli Fur during the redox and metal dependent dimerization process* ». L. Pecqueur, B. d'Autréaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. Michaud-Soret and B. Bersch. **Journal of Biological Chemistry** (2006), 281(30), 21286-21295.
- 4 « *The crystal structure of Bacillus subtilis PerR-Zn reveals a novel Zn(Cys)₄ structural redox switch* ». D.A.K. Traore, A. El Ghazouani, S. Ilango, J. Dupuy, C. Caux-Thang, L.

- Jacquamet, J.L. Ferrer, V. Duarte, J.M. Latour. *Molecular Microbiology* (2006), 61(5), 1211-1219.
- 3 « *Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein* ». R. Morales, A. Berna, P. Carpentier, C. Contreras-Martel, F. Renault, M. Nicodeme, M.L. Chesne-Seck, F. Bernier, J. Dupuy, C. Schaeffer, H. Diemer, A. Van-Dorselaer, J.C. Fontecilla-Camps, P. Masson, D. Rochu and E. Chabriere. *Structure* (2006), 14(3), 601-609.
- *2 « *Crystal structure of human iron-regulatory protein 1 as cytosolic aconitase* ». J. Dupuy, A. Volbeda, P. Carpentier, C. Darnault, J.M. Moulis and J.C. Fontecilla-Camps. *Structure* (2006), 14(1), 129-139.
- *1 « *Crystallization and preliminary X-ray diffraction data for the aconitase form of human iron-regulatory protein 1* ». J. Dupuy, C. Darnault, L. Brazzolotto, J.M. Moulis, A. Volbeda and J.C. Fontecilla-Camps. *Acta. Cryst.* (2005), F61, 482-485.

CONGRES ET MEETINGS

- **10^{ème} Club Oxydase**, LUXEMBOURG, LUXEMBOURG, mai 2017. "Assessment of the thermostability of a prokaryotic NADPH oxidase homolog using a new nanoDSF technique for crystallization assays" (poster);
- **10^{ème} Club Oxydase**, LUXEMBOURG, LUXEMBOURG, mai 2017. "Production and characterization of the deshydrogenase domain of a bacterial NOX, SpNox" (poster);
- **9^{ème} Club Oxydase**, GENÈVE, SWITZERLAND, mai 2015. "BOSS technology, a screening tool to increase the discovery of new therapeutic molecules" (communication orale);
- **39th FEBS Congress and The EMBO Meeting**, PARIS, FRANCE, août 2014. "Functional and structural insights into the NADPH oxidase family: new kids on the block" (poster);
- NOX Family NADPH Oxidases – **Gordon Research Conference**, LUCCA BARGA, ITALIE, mai 2014. "Characterization of a novel NOX protein from the NADPH oxidase family" (poster);
- **8^{ème} Club Oxydase**, PARIS, FRANCE, mai 2013. "Identification of new Nox family members in prokaryotic organisms by an innovative computing approach" (communication orale);
- **Association Française de Cristallographie Groupe Thématique Biologie**, LYON, FRANCE, juin 2004. "Crystallographic studies of the protein IRP1 (Iron Regulatory Protein 1), a human regulator of the iron homeostasis" (poster);
- **HERCULES** meeting GRENOBLE, FRANCE, mars 2002. "Structural approach of the hydrogenase's expression in *Rhodobacter capsulatus*: Hup UV, Hup T and Hup R" (poster).

DISTINCTIONS

Ces distinctions m'ont été accordées pour mon engagement en tant qu'officier de réserve au sein de nos armées. J'ai cessé d'être membre de la Garde Nationale en décembre 2021 après 11 ans de service.

- 1^{er} janvier 2021** : Médaille des Réservistes Volontaires de Défense et de Sécurité Intérieure, échelon « argent », agrafe « Garde Nationale » ;
- 1^{er} janvier 2014** : Médaille des Services Militaires Volontaires, échelon « bronze », agrafe « Service de Santé des Armées » ;
- 1^{er} janvier 2012** : Médaille de la Défense Nationale, échelon « bronze », agrafe « Service de Santé des Armées ».

Partie 1 :

De Grenoble à San Diego

Octobre 2001 à août 2008



TRAVAUX DE THESE - IBS / LCCP

Cette période a été riche en rencontres et en collaborations ce qui me permettra de tirer profit de mes résultats au-delà de mon départ pour les Etats-Unis. Cela se traduira par plusieurs publications dans un champ disciplinaire que je commence alors à arpenter, la biocristallographie, et sur une thématique que je vais explorer encore pendant plusieurs années, les métalloprotéines.

11 publications (Extremophiles 2009 / JMB 2008 / Acta. F 2007 / Ann. Pharm. Fr. 2007 / Cell Cycle 2006 / JBC 2006 / Mol. Mic. 2006 / 2 Structure 2006 / Science 2006 / Acta. Cryst. 2005) ;

1 chapitre de livre (Handbook of Metalloproteins 2007) ;

Sur la période considérée, j'ai supervisé le travail de 1 étudiant de L3, 1 étudiantes de M1 et 2 élèves ingénieures soit une période totale de 14 mois d'encadrement.

« Étude cristallographique de la protéine IRP1, un régulateur de l'homéostasie du fer. » Institut de Biologie Structurale - LCCP – Grenoble.

Octobre 2001 à mai 2005

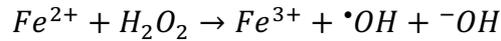
Introduction

L'homéostasie des métaux est gouvernée par deux conséquences intrinsèques à l'évolution. La première concerne les réactions d'oxydoréductions qui sont des processus indispensables à la vie. La deuxième est liée au fait que plusieurs voies métaboliques induisent la synthèse d'agents potentiellement toxiques lorsque les ions métalliques sont présents en quantités anormales. Cela a pour effet d'induire des dommages aussi bien vis-à-vis de la fonction même de la voie métabolique que sur les macromolécules présentes dans leur environnement direct.

Environ 20 mg de fer sont nécessaires pour renouveler les quelque 200 milliards de globules rouges produits quotidiennement, ce qui représente près de 80 % de la demande en fer chez un adulte normalement constitué. Un quart de la population mondiale est touché par un déficit en fer. Les anémies sont de fait un problème majeur de santé publique. Des cellules carencées en fer arrêtent de proliférer et peuvent finir par mourir si cet état perdure.

Le fer a une structure électronique qui lui permet d'avoir préférentiellement deux états d'oxydation différents, Fe^{2+} et Fe^{3+} , le rendant de ce fait propice à son utilisation en tant que cofacteur dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction. Cependant, cette même propriété chimique explique aussi l'effet toxique d'un excès de fer libre. Dans le cytoplasme, une partie

significative du fer est sous forme réduite et peut donc participer à un type de réaction chimique qui est nommée communément, réaction de Fenton :



Le fer ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène, ou des lipides peroxydés, pour générer du fer ferrique, des ions hydroxydes et des radicaux hydroxyles qui sont, eux, très réactifs (ou des radicaux lipidiques comme LO \cdot et LOO \cdot). Ces radicaux représentent alors un risque pour l'intégrité des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques pouvant déboucher sur la mort de la cellule.

Ainsi, la concentration en fer doit être soigneusement contrôlée et limitée. Beaucoup de pathologies résultent d'une accumulation de fer dans les tissus, mais une régulation systémique, c'est-à-dire au niveau de l'organisme, n'est pas une condition suffisante pour éviter ce genre de problème. En effet, des dérégulations locales dans l'homéostasie du fer contribuent aussi à la genèse de désordres neurodégénératifs, comme ce peut être le cas dans la maladie de Parkinson. Il existe donc différents mécanismes, que ce soit au niveau d'une simple cellule, d'un tissu ou encore d'un organisme entier, pour permettre d'équilibrer cette balance qui risque à tout moment de basculer du déficit à l'excès de fer, les deux ayant une finalité plutôt funeste.

Le système IRP/IRE

Les protéines impliquées dans l'incorporation, le stockage, l'utilisation et l'exportation du fer doivent donc être régulées de façon très stricte et d'une manière très coordonnée. Les signaux et les mécanismes, qui orchestrent leur expression, impliquent une modulation de leur transcription que ce soit en l'empêchant ou en modifiant la stabilité de leurs ARNm. Le système auquel est dévolu ce rôle, est le système IRP/IRE. Les protéines régulatrices du fer, les IRP pour *Iron Regulatory Proteins*, interagissent avec les IRE (*Iron Responsive Elements*) qui sont des structures conservées en forme d'épingles à cheveux trouvées dans les portions non traduites, les UTR pour *UnTranslated Region*, des ARNm codants pour les protéines relatives à la gestion de l'homéostasie du fer.

Il existe deux protéines IRP, IRP1 et IRP2 qui sont toutes les deux des homologues cytoplasmiques respectivement de 889 et 964 acides aminés et elles appartiennent à la famille des isomérasas à agrégat fer soufre¹⁻³. La protéine humaine IRP1 partage 61% d'identité de séquence et 80% d'homologie avec la protéine IRP2 humaine. De plus, IRP1 est à 22% identique à l'aconitase mitochondriale de porc, un membre bien caractérisé de la famille des isomérasas à agrégat fer soufre. Par analogie à la structure connue de l'aconitase

mitochondriale, IRP1 et IRP2 ont été subdivisées en trois domaines compacts liés à un quatrième par une région charnière flexible^{4,5} (Figure 1).

IRP1 est exprimée de façon constitutive alors qu'il a été initialement proposé que IRP2 n'était produite que de façon spécifique dans certains tissus mais il apparaît maintenant que l'abondance d'IRP2 dans les lignées cellulaires et les tissus, avait été prématurément sous-estimée⁶. Nos travaux se sont principalement portés sur IRP1 qui a pour particularité d'avoir un mode de régulation très singulier et, donc, peu répandu.

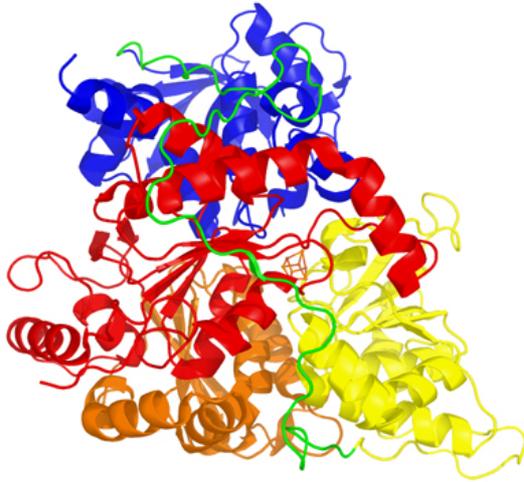


Figure 1 : Structure de l'aconitase mitochondriale de boeuf (code pdb 1C96)⁷. Les couleurs représentent les différents domaines de la protéine : le domaine 1 en rouge, le domaine 2 en orange, le domaine 3 en jaune, le linker en vert et le domaine 4 en bleu.

IRP1

IRP1 est régulée par le comportement peu habituel de son agrégat fer soufre^{8,9}. Dans une cellule pourvue d'un stock suffisant en fer soluble, IRP1 assemble un agrégat cubique [4Fe-4S] qui inhibe son activité de fixation aux IRE. De plus, cet agrégat convertit la protéine IRP1, en une aconitase cytosolique qui possède la même efficacité catalytique que son homologue mitochondriale¹⁰⁻¹². Cette activité d'isomérase permet à IRP1 de convertir le citrate en isocitrate. Cet isocitrate peut, à son tour, être transformé en α -cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase. Au cours de cette réaction, le NADPH produit peut servir à réduire la forme disulfide du glutathion (GSSG), en forme sulfhydryle (GS), grâce à l'intervention de la glutathion réductase¹³. La forme réduite du glutathion intervient alors dans la détoxification de la cellule en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques pour donner de l'eau, un dérivé alcool et de la GSSG. IRP1 joue donc un rôle dans le contrôle des activités redox de la cellule en stimulant la synthèse de NADPH cytoplasmique¹⁴. Ainsi, IRP1 est une protéine bifonctionnelle dans laquelle chacune des activités est mutuellement exclusive (Figure 2). En l'absence de fer dans la cellule, l'agrégat se désassemble par un mécanisme lent¹⁵ jusqu'à ce que l'apoIRP1 acquière la capacité de fixer l'ARN.

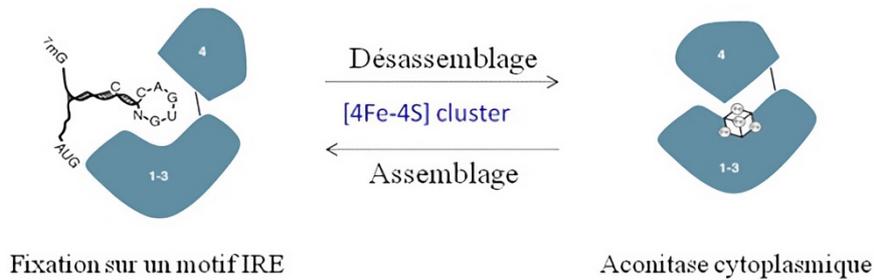


Figure 2 : Régulation d'IRP1. L'assemblage et le désassemblage de l'agrégat fer soufre est le mode de régulation qui permet à IRP1 de passer d'une forme active, c'est-à-dire capable de lier l'ARN, à une forme inactive possédant une activité aconitase et ce en réponse à différents stimuli.

Les cibles des IRP

Les IRP reconnaissent des séquences de nucléotides dans les régions non traduites, les UTR, de certains ARNm. Ces motifs IRE adoptent tous une structure commune en tige boucle et bien qu'une partie de leur séquence soit conservée (CAGUGU/C), il en existe de différents types.

Ces variations sont le reflet d'autant de régulations différentes dépendantes du fer qui peuvent ainsi fournir une plus grande finesse de réglage dans les réponses^{16,17}.

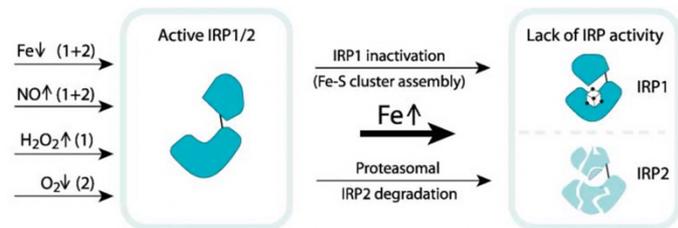
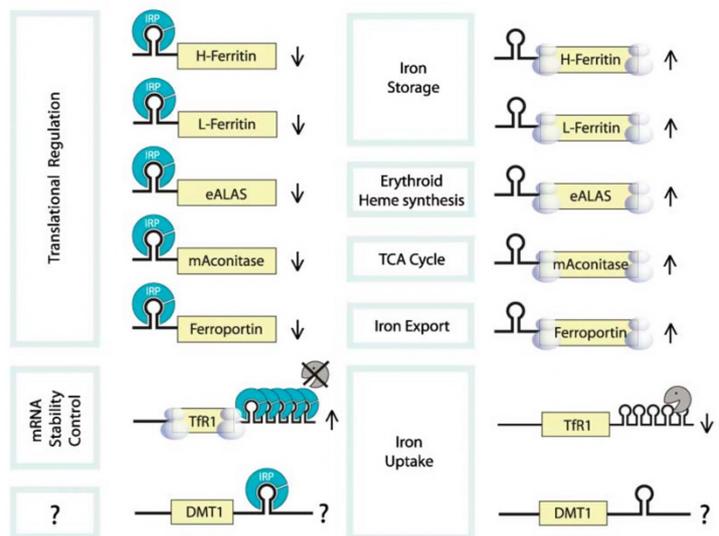


Figure 3 : Système de régulation IRP/IRE. Les protéines impliquées dans le stockage du fer, la synthèse de l'hème, le cycle de l'acide citrique, l'exportation ou encore l'absorption du fer sont régulées, de façon coordonnée, par l'interaction des IRP avec les IRE. Les IRP sont régulées par différents stimuli mais les deux isoformes sont sensibles à la concentration en fer disponible dans la cellule. D'après Hentze et al. (2004)¹⁸.



Par exemple, la ferritine (Ft) présente, pour ses deux sous-unités, des motifs IRE en 5' de ses ARNm. Les IRP, une fois fixées sur l'ARNm de la Ft, empêchent les interactions entre la petite sous-unité ribosomale¹⁹ et le facteur d'initiation 4F, bloquant ainsi la formation du complexe nécessaire à la traduction (Figure 3). De même l'ARNm du récepteur à la transferrine (TfR), qui régule l'incorporation du fer, a cinq motifs IRE dans son extrémité 3'²⁰. Les interactions des IRP avec un nombre aussi important d'IRE n'affectent en rien la traduction de l'ARNm et,

au contraire, cela augmente son temps de demi-vie en le protégeant des activités RNases (Figure 3). L'augmentation de la stabilité des transcrits aboutit à une expression plus importante du TfR, au niveau de la membrane cytoplasmique de la cellule et donc à une plus grande incorporation du fer.

Le projet

Le système sur lequel nous avons décidé de nous pencher, semblait être le point de passage obligé de toutes les protéines impliquées de près ou de loin dans l'homéostasie du fer chez les vertébrés. En effet, les protéines IRP1 et IRP2 sont les deux seuls maîtres régulateurs de tout un ensemble aussi complexe et fin que celui de l'incorporation, du stockage, de l'exportation ou encore de l'utilisation du fer au sein des cellules, des tissus et d'une façon beaucoup plus large de l'organisme.

La forme aconitase d'IRP1, nous imposait l'utilisation d'une atmosphère anaérobie et donc l'emploi d'une boîte à gants ce qui a compliqué l'obtention de cristaux. La résolution du problème de la phase a ensuite été particulièrement délicate. La taille d'IRP1 était telle que la présence de l'agrégat [4Fe-4S] n'a pas été suffisante pour résoudre la structure de la protéine par les méthodes classiques de diffusion anormale (SAD ou MAD). De plus, malgré l'homologie avec l'aconitase mitochondriale de bœuf, la technique du remplacement moléculaire n'a rien donné et nous avons dû nous orienter vers la recherche de dérivés d'atomes lourds. Enfin, notre collaboration avec un laboratoire de Chicago, travaillant sur la forme IRP1/IRE, nous a permis de participer à la résolution de la structure de ce complexe.

Résultats et discussion

Description générale

Les trois premiers domaines sont fortement associés et forment une dépression peu profonde dans laquelle ils se rejoignent de façon contiguë près du centre de la molécule. L'agrégat fer soufre est lié à trois cystéines du troisième domaine à l'intérieur de cette dépression. Le quatrième domaine est rattaché aux trois premiers par un long segment polypeptidique qui sert de lien charnière, ou *linker*, à la protéine (Figure 4A). La forme du quatrième domaine est complémentaire de la surface formée par les trois premiers domaines. L'interface entre le quatrième domaine et les trois premiers est partiellement occupée par des molécules de solvant et comprend majoritairement des contacts entre acides aminés polaires. Par conséquent, une fissure étendue est formée, conduisant, selon plusieurs chemins d'accès possibles, de la surface

à l'agrégat fer soufre, au cœur de la protéine. La structure, dans son ensemble, est très proche de celle de l'aconitase mitochondriale⁴ et les domaines 2 et 4 sont les mieux conservés et les plus facilement superposables. Malgré la faible identité reliant IRP1 à l'aconitase mitochondriale, il est intéressant de constater que les deux structures sont relativement proches l'une de l'autre, surtout dans l'environnement direct du cœur réactionnel de la protéine (Figure 4B). Ceci semble important, tant il est clair que la protéine IRP1 catalyse la même réaction que son homologue mitochondrial et avec une aussi grande efficacité.

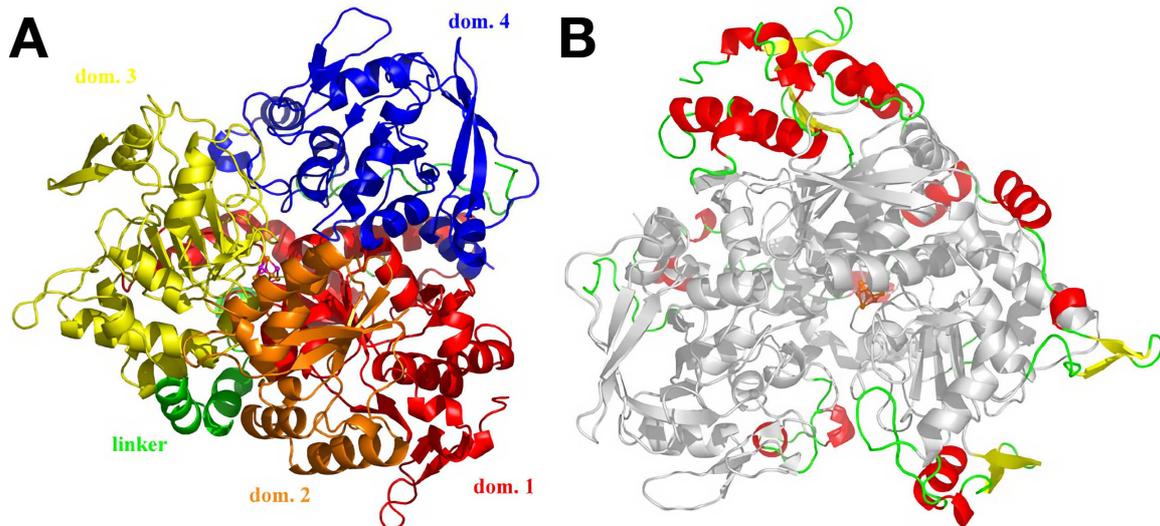


Figure 4 : A) Structure de la protéine IRP1. Les domaines 1 (résidu 1 à 240), 2 (241 à 368) et 3 (369 à 592) forment la partie amino-terminale, respectivement rouge, orange et jaune, alors que la partie carboxy-terminale est composée du domaine 4 en bleu (660 à 889), ces deux parties étant reliées par un polypeptide en vert (593 à 659) qui sert de lien au sein de la protéine. B) Conservation des éléments de structure de mAcn chez IRP1. Les structures similaires à mAcn chez IRP1 sont colorées en gris alors que le rouge et le jaune servent à modéliser les hélices et les brins β venant s'ajouter à IRP1. Le vert, quant à lui, représente les boucles non structurées.

L'activité aconitase d'IRP1

L'alignement des séquences d'IRP1 et de l'aconitase mitochondriale de bœuf n'a pu être réellement efficace qu'après une construction complète de la protéine IRP1 et son alignement structural *in silico* avec l'aconitase. Sur les bases de cet alignement de séquence, nous avons pu identifier les 21 acides aminés indispensables à l'activité isomérase de la protéine, en plus de la présence de l'agrégat fer soufre. Les résidus sont considérés comme faisant partie du site actif, s'ils sont en contact avec l'agrégat ou s'ils forment des liaisons avec le substrat ou, enfin, s'ils forment des liaisons hydrogène avec un résidu directement en contact avec le substrat. Les résidus du site actif peuvent être regroupés de la manière suivante : les acides aminés impliqués dans les interactions avec l'agrégat fer soufre sont les cystéines 437, 503 et 506 qui lient trois (Fe1, Fe2 et Fe3) des quatre fers de l'agrégat ensuite l'asparagine 535 qui fait une liaison

hydrogène avec le soufre S1 de l'agrégat alors que l'asparagine 298 en fait une avec le soufre de la cystéine 437 et enfin l'isoleucine 507 qui a un contact hydrophobe significatif avec l'agrégat (Figure 5A).

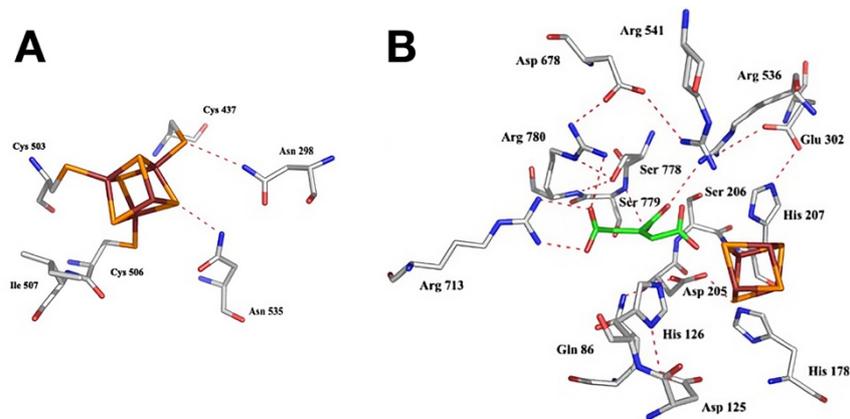


Figure 5 : A) Représentation des acides aminés impliqués dans les interactions avec l'agrégat fer soufre. B) Représentation des acides aminés impliqués dans des contacts avec le substrat. Dans cette figure, le *cis*-aconitate a été modélisé.

Viennent ensuite les acides aminés interagissant avec le substrat ; en premier lieu les trois paires His - Asp/Glu (Asp 100 - His 101, Asp 205 - His 178 et Glu 302 - His 207), les quatre arginines qui forment des contacts avec les groupements carboxyliques du substrat (les résidus 536, 541, 713 et 780), les résidus qui font des liaisons hydrogène avec le substrat (Gln 86, Ser 206 et Ser 779) et enfin la serine 778 à la base du mécanisme catalytique. Il ne faut pas oublier à cette organisation, la présence de l'aspartate 678 qui interagit avec les arginines 541 et 780, via la formation de ponts salins. D'une manière globale, le site actif d'IRP1 est un système complexe de résidus qui forment un réseau de liaisons hydrogène avec le substrat, l'agrégat fer soufre, les molécules d'eau ainsi qu'avec d'autres résidus de la protéine. L'implication de ces 21 résidus explique, en partie, pourquoi cette enzyme est une aussi grosse protéine. Le site actif présente aussi une charge électrostatique nettement positive, à cause de la présence des quatre arginines et du fait que les trois histidines sont appariées avec les aspartates et le glutamate présents dans le site actif (Figure 5B). Cette caractéristique est clairement constitutive des conditions nécessaires à la fixation de substrat anionique.

Le mécanisme catalytique

IRP1 catalyse quatre réactions stéréospécifiques : la déshydratation du citrate ou de l'isocitrate en *cis*-aconitate et la réhydratation du *cis*-aconitate en citrate ou en isocitrate. Les différentes études menées sur l'aconitase et IRP1 ont permis de mettre au point un modèle catalytique dans

lequel la transformation du citrate en isocitrate se fait via un intermédiaire réactionnel qui est le *cis*-aconitate (Figure 6).

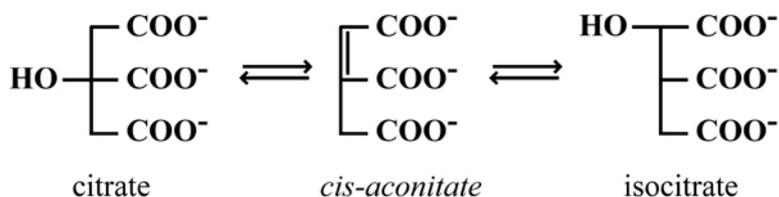


Figure 6 : Réaction d'isomérisation du citrate en isocitrate avec son intermédiaire réactionnel, le *cis*-aconitate.

Le *cis*-aconitate est censé se lier à l'agrégat fer soufre de deux manières différentes, l'une appelée mode citrate et l'autre mode isocitrate. Ces deux modes de fixation sont reliés par une rotation de 180° autour de la liaison C α -C β du substrat et l'ensemble de la réaction se produit en trois étapes : la déshydratation du citrate, la rotation du *cis*-aconitate et enfin la réhydratation du *cis*-aconitate pour obtenir l'isocitrate (Figure 7).

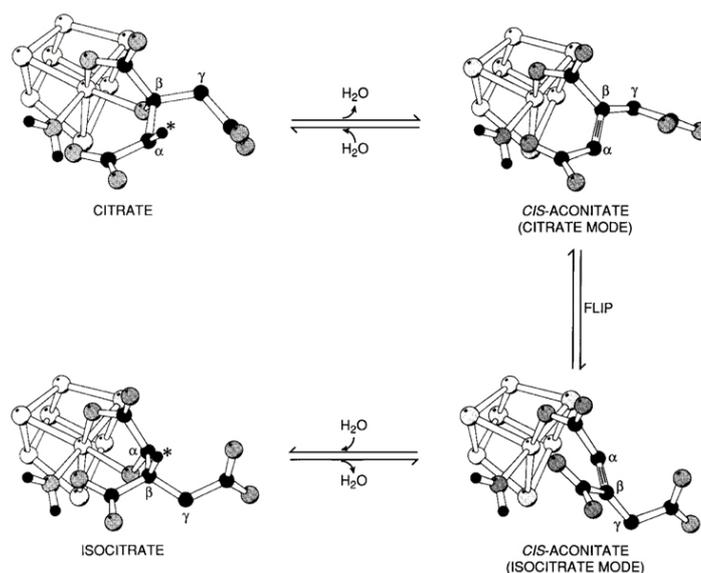


Figure 7 : Modèle de mécanisme réactionnel catalysé par IRP1 et l'aconitase. Le produit intermédiaire, le *cis*-aconitate, est proposé comme se fixant de deux manières différentes selon une rotation de 180° par rapport à la double liaison C α -C β . L'astérisque note le proton qui est stéréospécifiquement enlevé au citrate pour être remplacé sur l'isocitrate. L'atome d'hydrogène de la molécule d'eau lie le seul fer non coordonné par les cystéines, Fe4. D'après Lauble et al. (1994)²¹.

Interaction IRP1/IRE

Notre collaboration avec le laboratoire de Karl Volz du Département de Microbiologie et d'Immunologie de l'université de l'Illinois à Chicago, nous a permis d'apporter notre expertise à la résolution de la structure tridimensionnelle du complexe IRP1/IRE. La structure du complexe IRP1/IRE a montré que la protéine ne fixait qu'un seul motif IRE grâce à deux sites

spatialement distincts. La protéine IRP1 adopte, dans le complexe avec le motif IRE, une forme en L où les domaines 3 et 4, de la forme aconitase, viennent se positionner perpendiculairement à un corps central composé des domaines 1 et 2 (Figure 8).

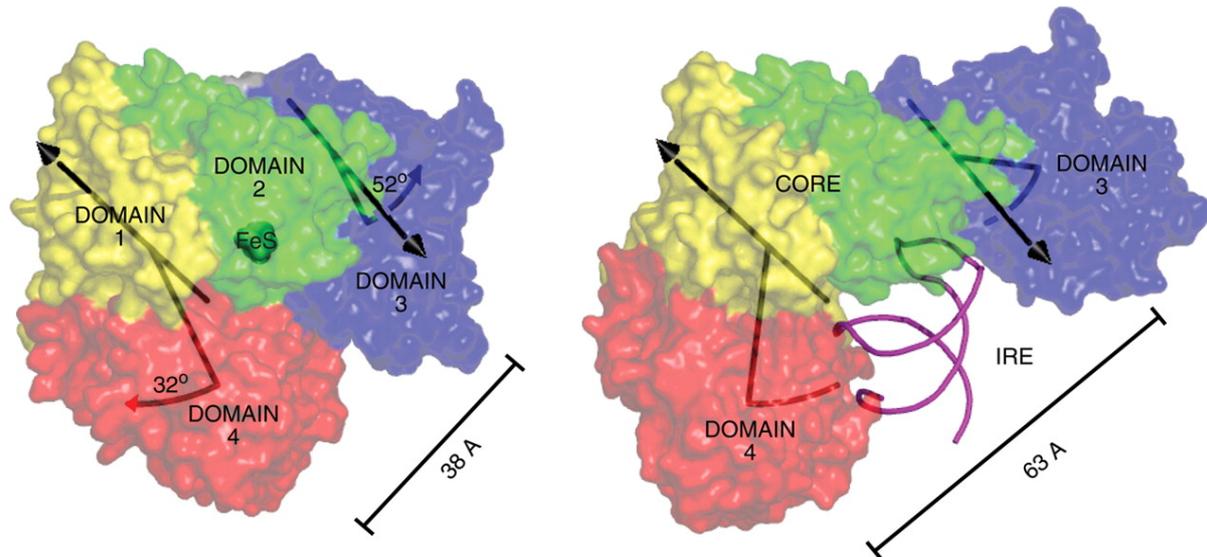


Figure 8 : Différences de position des domaines entre la forme aconitase et le complexe IRP1-IRE. Les domaines 1 et 2 de la forme aconitase correspondent au corps du complexe IRP1-IRE. Les deux molécules sont représentées dans la même orientation afin de montrer les déplacements des domaines 3 et 4. Les surfaces, semi-transparentes, permettent de visualiser l'agrégat FeS de la forme aconitase ainsi que les axes de rotation autour desquels les domaines 3 et 4 pivotent. Les arcs symbolisent le mouvement des centres de masse des domaines 3 et 4.

Le motif IRE, en forme de tige-boucle, est fixé à la protéine grâce à une large ouverture concave et au travers de deux zones de contacts directs entre l'IRE et IRP1. Ces deux zones sont localisées très précisément à la base de la tige et au sommet de la boucle. Ainsi deux résidus de la boucle, A15 et G16, sont exposés dans une cavité formée par l'interface entre les domaines 2 et 3 (Figure 9). Les liaisons de l'A15, la G16 et l'U17 fournissent spécificité et stabilité des interactions vis-à-vis de ce site. La fixation de la protéine, à la base de l'IRE, est centrée autour du nucléotide C8 qui s'insère dans une poche sur la face interne du domaine 4. Cette haute affinité des interactions entre IRP1 et l'IRE est expliquée par les nombreux contacts observés entre la protéine et les différentes régions de l'ARN. Les interfaces représentent respectivement 1400\AA^2 du côté terminal de la boucle de l'IRE et 1300\AA^2 à sa base.

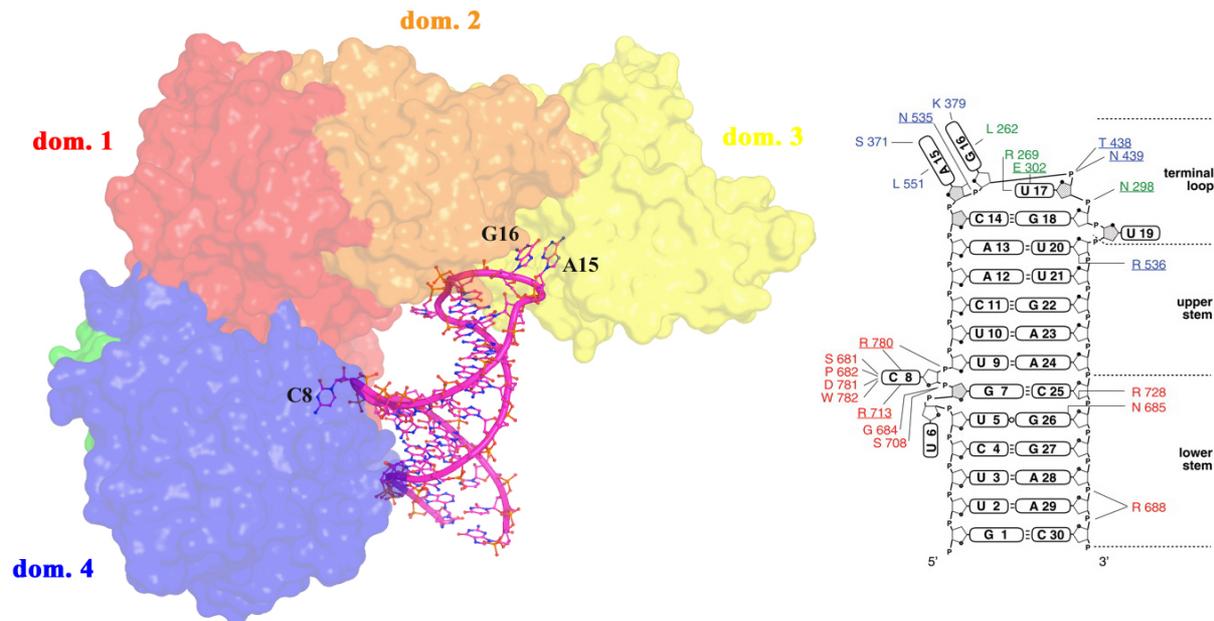


Figure 9 : L'A15 et la G16 occupent une cavité formée par les domaines 2 et 3 et la C8 s'insère dans une poche du domaine 4. Un résumé des interactions entre l'IRE et la protéine IRP1 est représenté à droite. Les acides aminés soulignés sont aussi impliqués dans la formation du site actif de la forme aconitase d'IRP1.

Les nombreux réarrangements, nécessaires à IRP1 pour osciller entre les fonctions d'aconitase cytoplasmique et de régulateur post-traductionnel, apparaissent couplés à une reconfiguration interne de la protéine qui s'avère être un élément crucial. Le déplacement du domaine 3 est accompagné par une reconfiguration de deux segments fonctionnellement importants à l'interface des domaines 2 et 3. Ces segments, régions 430 et 530, ont des rôles aussi bien structuraux que fonctionnels en permettant, soit le maintien de l'agrégat FeS pour la fonction aconitase, soit la mise en place de nombreuses interactions avec l'IRE dans le cas de la formation du complexe. La distance importante entre les deux sites en contact avec l'IRE, 30Å, permet à chacun de contribuer individuellement à la spécificité de l'interaction et à sa stabilité. Ceci confère un avantage manifeste dans la modulation et la finesse de la régulation de l'homéostasie du fer.

Conclusion personnelle

Ces travaux m'ont permis de me former à la collecte de données et au phasage anomal. La résolution de la structure de la protéine IRP1 a été particulièrement compliquée et j'ai dû faire preuve de pugnacité pour arriver à résoudre ma première structure. Cela sera valorisé dans trois publications²²⁻²⁴ ainsi qu'un chapitre de livre. Durant cette période j'aurai aussi eu l'opportunité d'accompagner 4 étudiants au cours de leurs formations par la recherche (1 L3, 1 M1 et 2 élèves ingénieures).

TRAVAUX DE POST-DOCTORAT – TSRI / STEVENS LAB

Le Scripps me fait découvrir une autre dimension dans le mot Science. Je vais poursuivre ma formation en cristallographie et commencer à me familiariser avec l'utilisation des détergents et des protéines membranaires ce qui se révélera important pour la suite de ma carrière. Cette période de ma vie demeure l'une des plus belles que ce soit professionnellement ou personnellement.

4 publications (PLoS pathogens 2013 / Applied and environmental microbiology 2011 / JMB 2010 / PLoS pathogens 2008) ;

1 brevet international (WO2010127258A1) ;

Sur la période considérée, j'ai supervisé le travail de 1 étudiant de Master soit une durée de 4 mois d'encadrement.

« Toxine Botulique, Docteur Jekyll ou Mister Hyde ? » The Scripps Research Institute - Stevens Lab. - La Jolla, USA

Mars 2006 à Août 2008

Introduction

Les neurotoxines produites par *Clostridium botulinum* (BoNTs) sont parmi les plus mortelles au monde pour l'homme. D'infimes quantités suffisent à causer de sévères paralysies qui peuvent aboutir à la mort par insuffisance respiratoire. Le centre américain de contrôle et de prévention des maladies (Center for Disease Control and Prevention or CDC) a classé la toxine botulique parmi les armes biologiques potentielles, catégorie A (menace maximale), à cause de son extrême efficacité, de sa létalité, de sa facilité de production et de transport et du besoin prolongé de soins intensifs des personnes affectées. Malgré cette haute toxicité, de nombreuses applications médicales ont émergé ces 25 dernières années. Ainsi, la toxine botulique est ordinairement employée lors du traitement de nombreux troubles moteurs telles les dystonies, mais aussi dans les troubles neuromusculaires tels que les blépharospasmes, les strabismes, les spasmes hémifaciaux et certains types de spasticité chez l'enfant. Les injections de toxine botulique sont aussi l'une des corrections cosmétiques les plus communément effectuées à travers le monde à ce jour.

Bien qu'énormément de choses soient maintenant connues concernant l'action catalytique de la toxine, peu de chose était alors connu sur les détails de la reconnaissance et de l'adhésion

cellulaire par la toxine, prémices au processus de translocation membranaire. Afin d'approfondir ces connaissances nous avons choisi de nous focaliser sur le mode d'interaction entre les molécules membranaires présentes à la surface des cellules et la toxine botulique. Dans ce but, nous avons identifié une nouvelle famille de récepteurs, susceptible d'être une cible de choix pour la toxine. La résolution de la structure de la toxine complexée avec un sucre (ganglioside) et celle avec la synaptotagmine (récepteur membranaire), déjà résolue au laboratoire, a permis d'appréhender les mécanismes mis en place, en vue de la translocation de la toxine vers le milieu cytoplasmique. Ces études avaient pour but ultime, le développement de la future génération d'agents thérapeutiques et d'outils de diagnostic précis et rapides à mettre en œuvre.

Le projet

Les structures des holotoxines de sérotype A et B (BoNT/A et BoNT/B) présentent trois domaines fonctionnels bien définis^{25,26}. La neurotoxine est produite sous la forme d'une protéine de 150 kDa qui doit être clivée afin de devenir active. Après cette protéolyse, les deux chaînes continuent à être associées grâce à de nombreuses interactions entre elles et tout particulièrement un pont disulfure qui lie, de façon covalente, la sous-unité catalytique, aussi appelée chaîne légère (environ 50 kDa), au reste de la protéine appelée chaîne lourde (environ 100 kDa). La partie C terminale de la chaîne lourde est plus connue sous le nom de « domaine de liaison », car elle est impliquée dans la fixation de la toxine à la surface des motoneurones, alors que la partie N terminale est appelée « domaine de translocation » (Figure 10). Le domaine de liaison se lie à des sucres et des récepteurs membranaires localisés sur les terminaisons pré-synaptiques des nerfs, ce qui conduit à l'endocytose de la toxine.

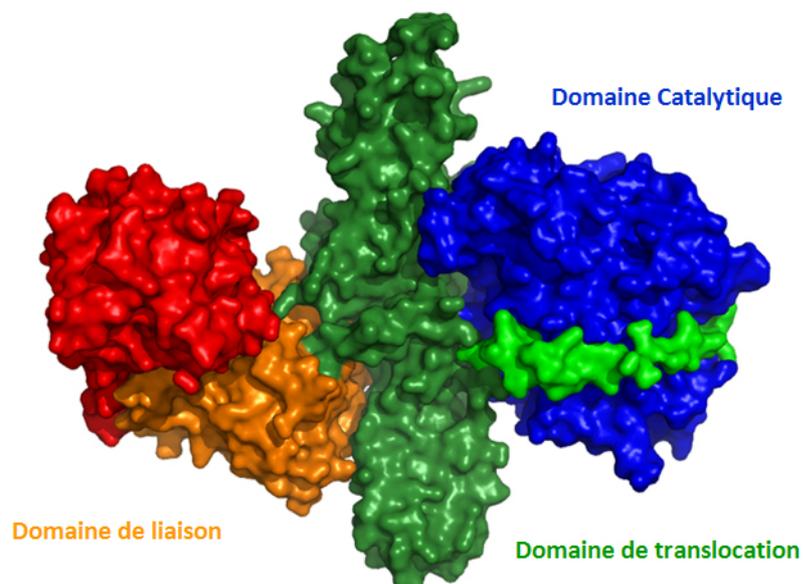


Figure 10 : Structure de la toxine botulique A. Les trois domaines sont représentés selon des couleurs différentes. Le domaine catalytique est bleu, le domaine de liaison est rouge pour la partie C terminale et orange pour sa partie N terminale et le domaine de translocation est vert. Le vert clair représente la ceinture qui maintient le domaine catalytique en contact étroit avec le reste de la protéine, elle fait partie intégrante du domaine de translocation.

Le récepteur membranaire SV2 a été proposé comme étant le récepteur interagissant avec la neurotoxine de type A²⁷, alors que les Synaptotagmine I et II (Syt. I et II) ont été identifiées respectivement comme fixant les neurotoxines de sérotype B et G²⁸⁻³¹. En 2008, seule la structure du complexe entre le récepteur Syt. II et BoNT/B avait été résolue^{28,29}. Les sucres de la famille des gangliosides ont été montrés comme étant essentiels dans le mécanisme de reconnaissance et de fixation des BoNT de sérotype A, B et G. Quand la biosynthèse de ces sucres, les gangliosides, est inhibée dans des cellules neuronales, la BoNT/A était inactive à cause de son incapacité à pénétrer dans les cellules³². Les gangliosides sont constitués d'une partie lipidique liée à une tête polysaccharidique, présentée à la surface de la membrane. La tête polysaccharidique contient des acides sialiques, mais leur nombre, leur nature et leur position varient d'un ganglioside à l'autre (Figure 11).

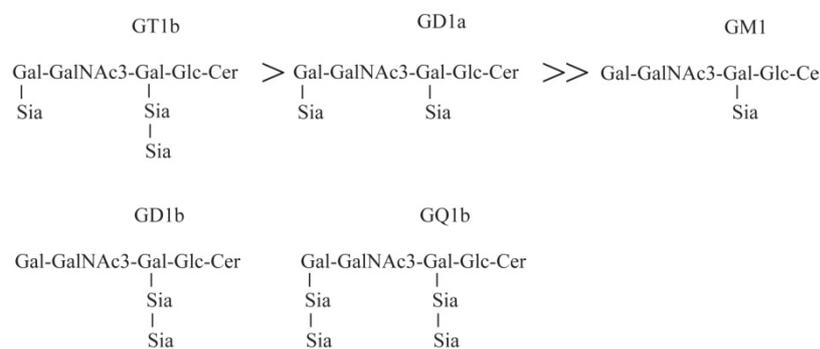


Figure 11 : GT1b, GD1a et GM1 sont classés dans un ordre décroissant d'affinité pour la BoNT/A. GD1b et GQ1b sont représentés à titre indicatif.

Un modèle à deux récepteurs avait été proposé pour le processus d'infection de la BoNT, nécessitant la fixation à la fois à un récepteur protéique et à un ganglioside corécepteur^{31,33}. Toutes les BoNT, à l'exception du sérotype D, utilisent les gangliosides comme corécepteur^{34,35}. L'extrême efficacité des BoNT et leur très haute affinité pour leurs cibles est le fruit de cette interaction simultanée entre la toxine avec ses deux partenaires membranaires à la surface de la cellule.

Résultats et discussion

Un analogue de GT1b a été utilisé afin de s'affranchir des problèmes liés à la partie hydrophobe du ganglioside (Figure 12A). La résolution de la structure du complexe formé par GT1b et le domaine de fixation de la neurotoxine de type A a permis de cartographier avec précision les acides aminés impliqués dans la fixation du sucre (Figure 12B et C).

Des études antérieures réalisées sur la toxine tétanique ont montré clairement, de manière biochimique mais aussi structurale, que cette toxine (TeNT), de la famille des *Clostridium*, fixait aussi bien GT1b, GQ1b que GD1b (Figure 11 et 13A). L'alignement des différentes structures a permis, couplé à des études de bioinformatique, d'identifier une région conservée,

assimilables à une mâchoire qui ne permet pas n'importe quel degré de liberté. En effet, le domaine de fixation de la toxine est pris en tenaille, ne permettant que la rotation selon l'axe passant par les deux récepteurs. Il s'en suit une présentation du domaine de translocation qui ne peut se faire que par les extrémités de ses hélices α (Figure 14E et F). Ceci semble corroboré par des études de neutralisation, où des anticorps neutralisants ont permis de bloquer la translocation de la toxine dans la cellule en interagissant spécifiquement avec ces régions du domaine de translocation^{37,38}.

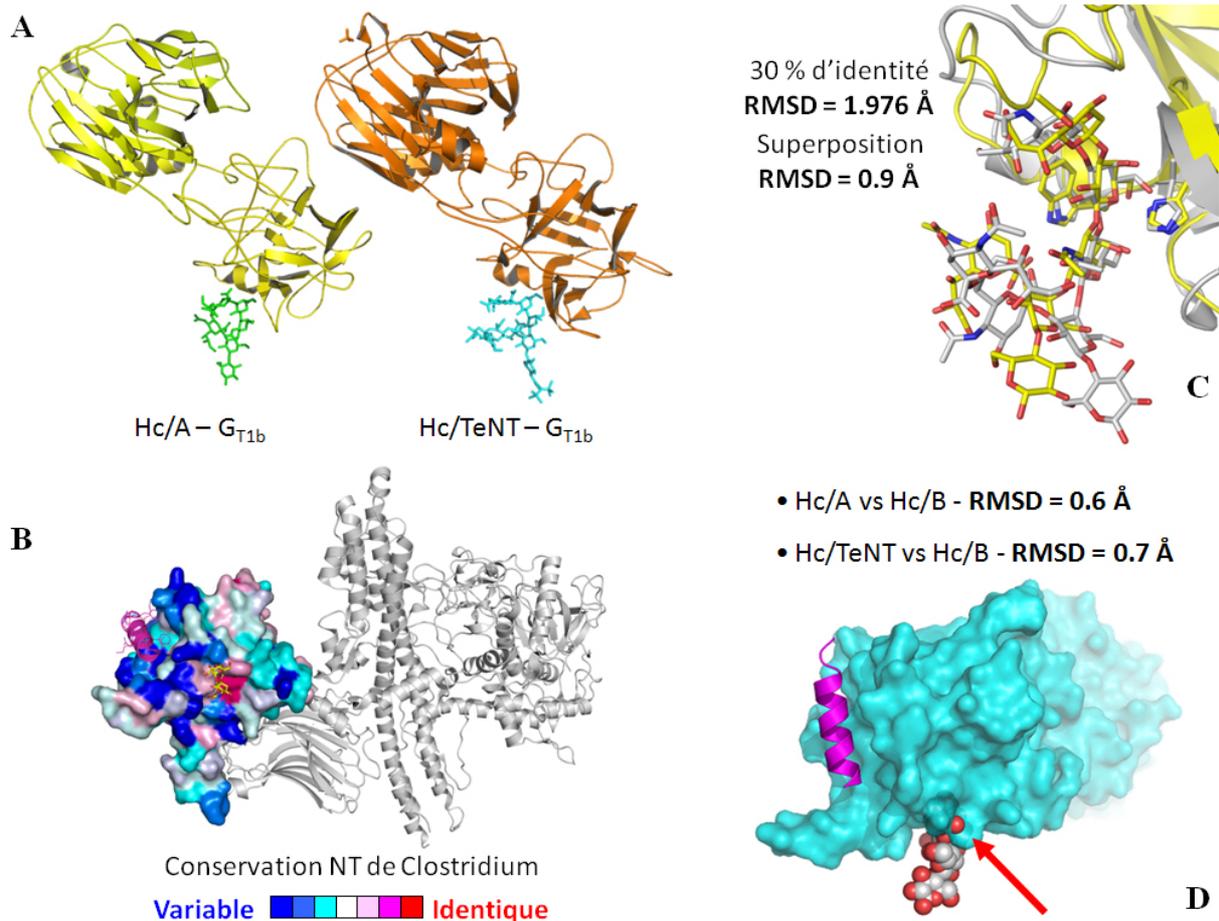


Figure 13 : A) représentation des structures des domaines de fixation de la BoNT/A et de la TeNT complexés avec GT1b, selon la même orientation. B) identification des acides aminés conservés dans les différents domaines de fixation des toxines de la famille *Clostridium*. En rouge le motif présentant le moins de variabilité s'avère être celui qui vient fixer les gangliosides. C) superposition des complexes GT1b-BoNT/A et GT1b-TeNT. Bien que l'identité ne soit que de 30% dans la région de fixation du GT1b, le motif structural est néanmoins hautement conservé avec un RMSD inférieur à 1Å. D) comparaison entre les différents domaines de fixation des BoNT/A, BoNT/B et TeNT. Les structures sont très conservées, ce qui permet de modéliser la fixation de GT1b sur la structure du complexe entre BoNT/B et Syt. II.

Ces résultats soulignent l'importance du site de fixation de GT1b à la surface de la toxine botulique. Des inhibiteurs, ciblant spécifiquement cette zone d'interaction, pourraient empêcher le passage de la toxine dans les cellules.

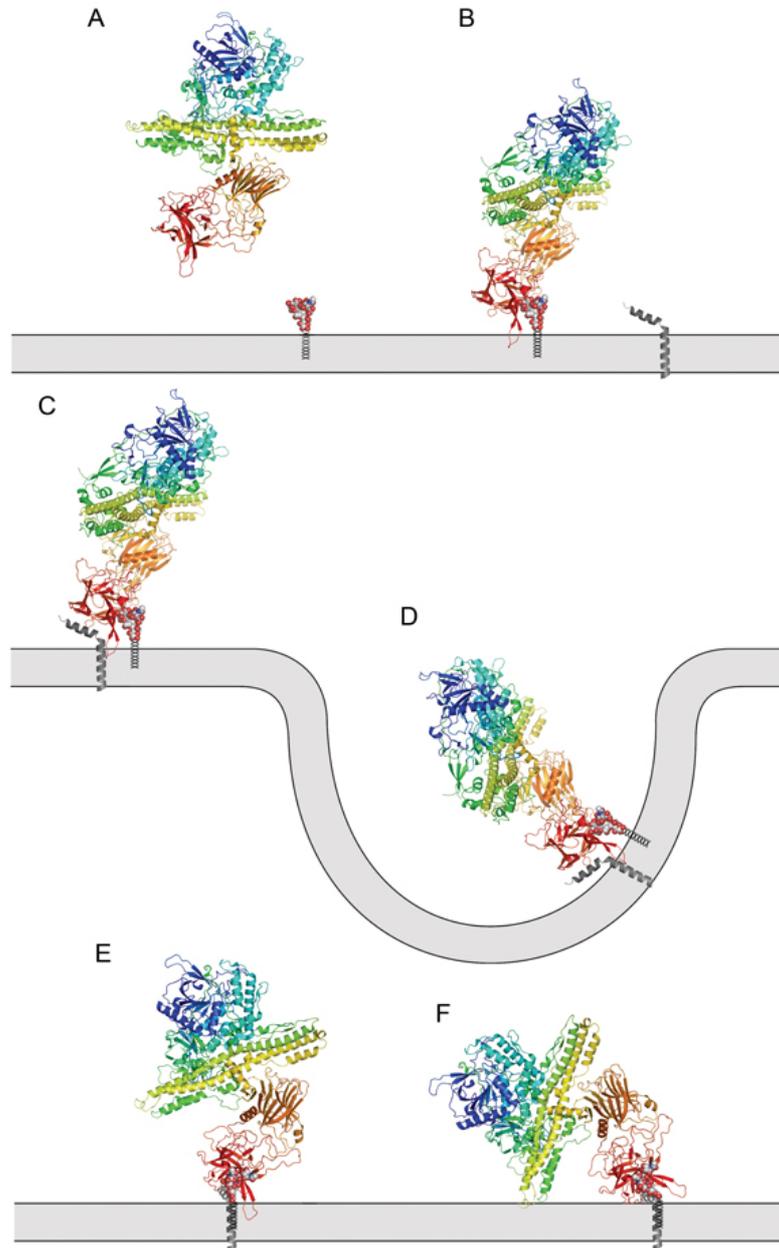


Figure 14 : GT1b a été modélisé dans le complexe BoNT/B-Syt. II basé sur la structure du complexe entre le domaine de fixation de BoNT/A et GT1b.

Conclusion personnelle

Les résultats obtenus pendant ce post-doctorat m'ont permis de cosigner quatre articles³⁹⁻⁴², dont un co-premier auteur, ainsi qu'un brevet international⁴³. J'ai eu aussi la possibilité d'encadrer une étudiante lors de son « *Master degree* ».

Partie 2 :

De l'UJF à l'UGA



MON RECRUTEMENT A L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Je n'ai jamais voulu faire autre chose qu'enseignant-chercheur. A ce titre, je n'ai postulé qu'à un seul concours et je l'ai eu. Je découvre un nouveau monde dans lequel je trouve mes marques mais qui va aussi me demander beaucoup d'efforts afin de ne pas me faire aspirer par l'enseignement. Je vais pouvoir encadrer une étudiante en thèse dont le travail sera valorisé dans 2 articles, dont un où je suis dernier auteur (MBio 2017) et un brevet international où je suis aussi le responsable du projet. Sur cette période de 6 ans, de 2011 à 2017, je vais réussir à obtenir 544 000 euro de financement dont une ANR en tant que porteur (ANR BANDIT - ANR-17-CE11-0013 – 397 k€).

4 publications (Elife 2024 / BBA Biomembr 2019 / MBio 2017 / JBC 2016) ;

1 brevet international (WO2015162383A1) ;

Sur la période considérée, j'ai supervisé le travail de 11 collaborateurs dont 1 étudiante en thèse, 1 post-doctorant, 1 ingénieur et de nombreux étudiants en master et licence.

« La famille des NADPH oxydases, de nouvelles opportunités chez les procaryotes. » Institut de Biologie Structurale – Equipe Membrane et Immunité – Grenoble.

Septembre 2011 à novembre 2017

Introduction

Le stress oxydatif se produit lorsque l'équilibre entre la production de radicaux libres et leur élimination par les antioxydants est rompu. Les radicaux libres sont normalement générés dans le corps humain par des processus métaboliques. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), hautement réactives et capables d'attaquer les protéines, les lipides et les acides nucléiques, sont les principaux contributeurs aux dommages chez les organismes biologiques. Ces dommages comprennent des pathologies associées au vieillissement, des maladies cardiovasculaires, des troubles neurologiques, des stéatoses hépatiques, des cancers ou encore des inflammations chroniques⁴⁴. Cependant, il est également démontré que les ERO jouent des rôles essentiels dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation redox, la physiologie cérébrale, la pression artérielle, la différenciation cellulaire, la synthèse hormonale, ainsi que

dans le cas bien documenté du système immunitaire⁴⁵. Les systèmes de production des ERO comprennent la xanthine oxydase, la chaîne respiratoire mitochondriale, les peroxydases, les enzymes du cytochrome P450, la NO synthase endothéliale et les NADPH oxydases (NOX). Cette famille de protéines a été le premier système identifié à générer les ERO de manière dédiée et orientée, plutôt qu'en tant que sous-produit toxique.

Les NOX eucaryotes sont généralement connus pour catalyser le transfert d'un électron à travers la membrane vers l'oxygène moléculaire, entraînant la synthèse de l'anion superoxyde, la première espèce réactive de l'oxygène. Historiquement, gp91^{phox}, la NADPH oxydase des phagocytes désormais appelée NOX2, a été le premier NOX décrit comme produisant des ERO lors de l'explosion oxydative (*respiratory burst*) du processus d'immunité innée^{46,47}. Son premier homologue a été trouvé en 1996 chez le riz⁴⁸. Au cours des années suivantes, cinq autres NOX ont été identifiés chez les mammifères^{46,47,49-54}. La famille des NOX a ensuite été divisée en trois sous-groupes en fonction de la présence ou de l'absence de domaines supplémentaires associés aux modules de base de NOX2. Les NOX sont largement distribuées, ce sont des protéines modulaires spécifiques des tissus qui partagent, pour NOX 1 à 4, un noyau composé d'un domaine de type ferredoxine-NADP⁺ réductase (FNR)⁵⁵ et d'un domaine membranaire de type ferrique-réductase FRD (également appelé domaine YedZ chez les procaryotes)⁵⁶⁻⁵⁸. Ils peuvent également avoir, comme NOX5, un domaine de type calmoduline et, en plus, comme dans le cas de DUOX1 et DUOX2, un segment amino-terminal homologue à la peroxydase⁴⁵ (Figure 15). Outre NOX2, que l'on trouve à la fois dans les phagocytes, le tissu cardiaque et le cerveau, où il est impliqué respectivement dans la défense de l'hôte, la contraction musculaire et la dégénérescence neuronale⁵⁹, les enzymes NOX des tissus non immunitaires sont impliquées dans des processus tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose et la signalisation des récepteurs⁴⁵. En revanche, les enzymes DUOX sont impliquées dans les réactions qui impliquent les protéines de la matrice extracellulaire, telles que la synthèse des hormones thyroïdiennes^{60,61}.

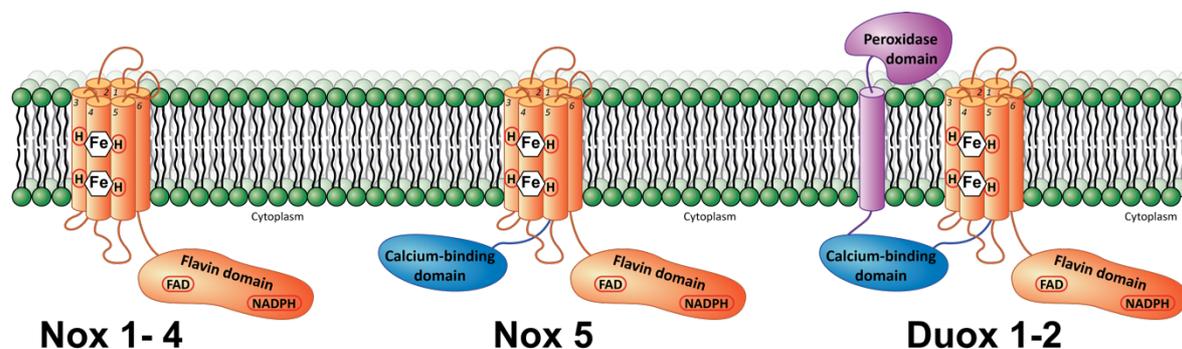


Figure 15 : Modèles des différents sous-types de NOX. Les losanges blancs schématisent les hèmes.

Bloquer les actions indésirables des enzymes NOX est une stratégie thérapeutique pour traiter les pathologies et les dommages liés au stress oxydatif. En plus des dommages induits par les ERO, la dérégulation des NOX peut avoir des conséquences physiologiques spécifiques comme, par exemple, dans le cas de la maladie granulomateuse chronique, des troubles auto-immuns, de l'hypothyroïdie ou de certaines pathologies cardiovasculaires et neurodégénératives^{60,62}.

Un contexte sociétal majeur, un exemple

Afin d'illustrer l'intérêt qui existe à travailler sur les NOX, l'exemple de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD - *non alcoholic fatty liver disease*) est marquant. La NAFLD est une accumulation excessive de graisse dans les cellules hépatiques. Elle est associée à l'obésité, à l'hypertension artérielle, à un taux élevé de cholestérol et au diabète. Certaines personnes peuvent développer une forme encore plus grave de NAFLD avec des lésions et des cicatrices hépatiques. Cette forme, appelée stéatohépatite non alcoolique (NASH), peut entraîner une insuffisance hépatique, un cancer du foie et, éventuellement, la mort^{63,64}. Les données cliniques et précliniques accumulées suggèrent que les lésions hépatiques chroniques entraînent la génération d'un stress oxydatif et indiquent que les ERO générés par les NOX jouent un rôle central dans la pathogenèse de la fibrose hépatique^{65,66}. Selon l'Organisation mondiale de la santé, la NAFLD est considérée comme le problème hépatique le plus courant dans le monde occidental, touchant 20 à 30 % de la population, dont la grande majorité n'est pas diagnostiquée. Bien que la plupart des patients atteints de NAFLD souffre de stéatose simple, environ 10 à 30 % développeront une NASH. Environ 15 % des patients atteints de NASH développeront une cirrhose du foie. Aux États-Unis, on estime que plus de 64 millions de personnes souffrent de NAFLD, avec des coûts médicaux directs annuels d'environ 103 milliards de dollars. En Allemagne, en France, en Italie et au Royaume-Uni, environ 52 millions de personnes souffrent de NAFLD, avec un coût annuel d'environ 35 milliards d'euro. Le taux annuel d'augmentation des coûts dus à la NAFLD est parallèle à la croissance annuelle de la prévalence de l'obésité aux États-Unis depuis 1994. Dans ce cas, la charge de la NAFLD sur 10 ans pourrait augmenter considérablement pour atteindre environ 1 005 milliards de dollars aux États-Unis et 334 milliards d'euro en Europe⁶⁷.

Trouver des molécules thérapeutiques ciblant spécifiquement et efficacement les NOX est un enjeu majeur de santé publique.

Une approche thérapeutique ?

Il existe plusieurs brevets sur des inhibiteurs des NOX mais la plupart sont de petites molécules conçues par *ligand-based drug design* qui est une méthode empirique et indirecte. Ceux-ci comprennent des anticorps, de petites molécules, des inhibiteurs peptidiques qui ciblent l'activation enzymatique ou encore des ARN interférents (siRNA) qui régulent à la baisse l'expression des enzymes⁶⁸⁻⁷⁰. Cependant, des études *in vivo* et cliniques ont montré que les inhibiteurs de NOX ne sont pas suffisamment efficaces et présentent plusieurs effets secondaires en raison de leur manque de spécificité envers les différentes isoformes de NOX. Une autre façon de découvrir et/ou d'améliorer un médicament est de procéder à une conception basée sur la structure de la cible, une méthode plus directe encore faut-il avoir la structure concernée.

Etat de l'art, en 2011

Traditionnellement, la présence des enzymes NOX était associée aux exigences fonctionnelles liées à la multicellularité⁷¹. Une exception est la levure, qui est un organisme unicellulaire connu pour contenir des ORF homologues à NOX dans son génome. Cependant, à l'exception d'un cas⁷², ces ORF n'ont pas été décrits comme des NOX mais comme des ferriques réductases⁷³. Bien que la ferredoxine-NADP⁺ réductase (FNR) et YedZ, le modèle du domaine réductase ferrique bactérienne (FRD)^{56-58,74}, soient trouvés séparément chez les procaryotes, la présence de gènes *nox* fonctionnels dans les génomes bactériens n'a pas encore été établie⁷⁵.

Il est notoirement difficile de purifier des quantités suffisantes de protéines NOX natives avec une qualité biochimique compatible pour de la biologie structurale^{76,77}. NOX2, recombinante et fonctionnelle, a été produite avec succès dans un système d'expression hétérologue de mammifère⁷⁸⁻⁸⁰, mais aussi dans la levure^{81,82} et dans des cellules d'insecte⁸³. Malgré de gros efforts pour augmenter les échelles de production⁸⁴ et pour améliorer les stratégies de purification⁷⁶, NOX2 a toujours été obtenue en quantité insuffisante. Plusieurs tentatives pour l'exprimer dans *E. coli* n'ont pas été couronnées de succès et seule la production d'une forme tronquée de sa partie C-terminale a été possible^{85,86}. L'expression en milieu *cell free* n'a pas été plus concluante^{87,88}.

En 2009, une structure cristalline de la moitié du domaine cytosolique de NOX2 a été déposée dans la PDB (Figure 16), mais il n'y a jamais eu de publication associée (code PDB 3A1F). La même année, une petite partie du domaine régulateur d'une NADPH oxydase végétale a été résolue et publiée⁸⁹, mais cette protéine est plus proche de NOX5 que de NOX2 et la structure en question couvre un domaine absent dans NOX2 (code PDB 3A8R).

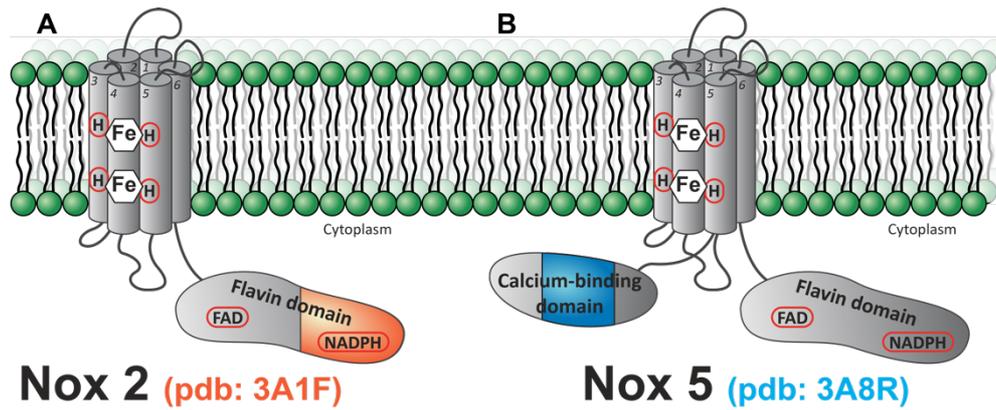


Figure 16 : Les deux seules structures NOX tronquées disponibles dans la PDB lors de mon recrutement en 2011. A) En orange, la petite partie du domaine C-terminal de NOX2 résolue par cristallographie aux rayons X. B) En bleu, la structure Rboh transposée sur son homologue NOX5.

Le projet

En 2011, toutes les études supposaient que le règne bactérien était dépourvu d'enzymes NOX^{57,71,75}. Afin de remettre en question ce dogme, nous avons conçu un programme utilisant un algorithme de recherche original qui nous a permis d'extraire plus de 500 candidats NOX du règne procaryote. Cette identification des enzymes NOX bactériennes représentait une avancée majeure dans ce domaine. Nous avons travaillé sur plusieurs de ces protéines et caractérisé en détail une protéine identifiée dans le génome de *S. pneumoniae*, que nous avons appelé SpNox. Nous avons démontré que cette protéine de fonction inconnue est une authentique protéine NOX. Cette protéine possède la même activité NADPH oxydase que les NOX humaines et est régulée par 80 % des inhibiteurs humains que nous avons testés.

Nous avons ainsi travaillé à sa purification, sa caractérisation aussi bien enzymatique que structurale mais aussi aux possibilités que cette découverte ouvrait sur les possibilités de criblage à haut débit en vue d'identifier de nouvelles molécules thérapeutiques.

Résultats et discussion

Identification et caractérisation de nouvelles NOX mais d'origine bactérienne

Nous avons identifié des motifs communs à toutes les protéines NOX eucaryotes connues. Sur la base de ces motifs, nous avons conçu un algorithme afin de les rechercher dans l'ensemble des séquences disponibles alors soit près de 80 000 000 d'ORF disponibles. Ainsi par l'utilisation de filtres successifs nous avons sélectionné 4 404 séquences d'acides aminés NOX présumées provenant de 1 492 organismes différents, dont plus d'un tiers étaient des bactéries. Par la suite, nous avons sélectionné un ensemble plus restreint de séquences provenant de tous

les domaines de la vie représentés. Finalement, 150 ORFs ont été sélectionnées pour construire un arbre phylogénétique élargi pour la famille NOX/FRE. L'arbre montre une division claire entre les eucaryotes et les procaryotes, ce qui peut avoir une signification évolutive (Figure 17).

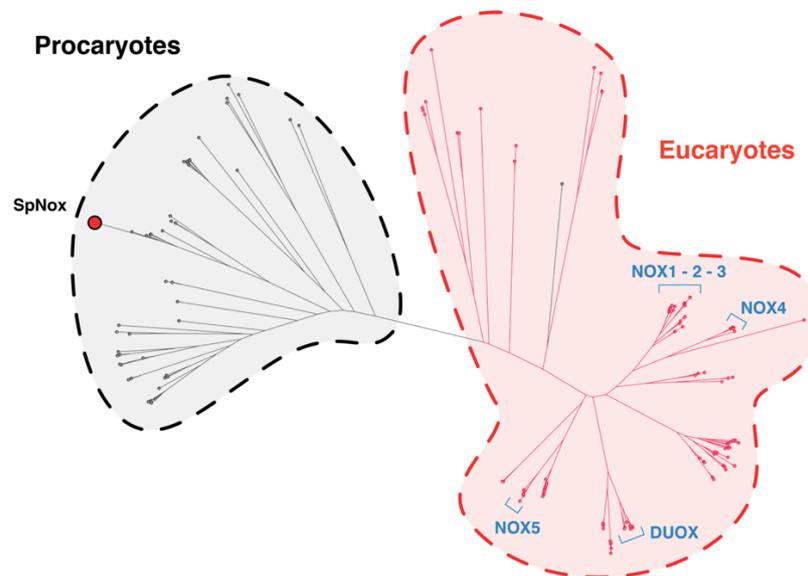


Figure 17 : arbre phylogénétique simplifié des 150 séquences de NOX provenant des genres représentatifs de la vie.

Pour confirmer que les séquences que nous avons extraites des génomes bactériens correspondaient à des enzymes NOX fonctionnelles, nous avons sélectionné des gènes d'*Acaryochloris marina*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus pneumoniae* (respectivement appelés AmNOX, EcNOX, PaNOX et le déjà mentionné SpNOX) pour une caractérisation supplémentaire. Leurs topologies protéiques prédites sont très similaires à celle calculée pour NOX2, sauf pour AmNOX qui est plus proche de NOX5. Les gènes sélectionnés ont été clonés et surexprimés dans *E. coli* et l'intégrité des protéines résultantes a été suivie par spectrophotométrie des extraits membranaires. En effet, les enzymes NOX eucaryotes sont connues pour avoir une signature spectrale avec des pics caractéristiques à 426 et 558 nm dans un spectre différentiel (réduit moins oxydé). Le contrôle négatif a été effectué avec la même souche d'*E. coli* transformée par un plasmide d'expression dépourvu de gène NOX bactérien présumé. SpNOX, suivi de PaNOX, étaient les protéines qui montraient les signaux spectroscopiques les plus forts. Sur la base de ces résultats, nous avons décidé de poursuivre notre étude avec SpNOX.

SpNOX présente un spectre typique de cytochrome b558 des enzymes NOX. SpNOX contenu dans la préparation membranaire génère un spectre similaire à celui de NOX2. Le spectre différentiel réduit au dithionite montrait un petit pic à 558 nm, une épaule à 530 nm et un pic

net à 426 nm (Figure 18A)⁹¹. Comme de nombreux autres cytochromes, SpNOX oxydé donnait un spectre avec une bande Soret caractéristique à 410 nm. La réduction des groupes hème b a été suivie par spectrophotométrie après l'ajout de NADPH. Des temps d'incubation croissants ont entraîné des pics plus prononcés à 426 nm et 558 nm tandis que le spectre diminuait à 450 nm. Ces changements spectraux indiquent une réduction de la flavine après un transfert d'électrons depuis le NADPH (Figure 18B)⁵¹. En outre, la réduction de l'hème montre que les électrons migrent du NADPH vers les groupes hème via le cofacteur flavine, ce qui est nécessaire pour les découpler (Figure 18B).

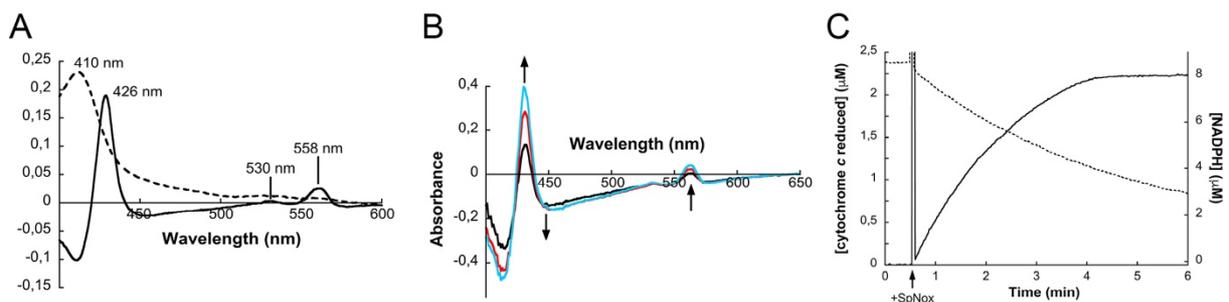


Figure 18 : Caractérisation enzymatique de SpNOX. A) Spectres différentiels (réduit moins oxydé, ligne pleine) et oxydés (ligne en pointillé) provenant d'une préparation membranaire d'*E. coli* exprimant SpNOX. Les pics typiques des protéines NOX sont mis en évidence. B) Spectres d'absorbance d'une préparation membranaire exprimant SpNOX en présence de 200 μM de NADPH. La réduction membranaire a été enregistrée séquentiellement après 2 min (ligne noire), 6 min (ligne rouge) et 10 min (ligne bleue). La réduction de l'hème a été suivie par l'augmentation de la hauteur des pics à 426 et 558 nm, montrant que les électrons peuvent atteindre le cœur membranaire de SpNOX. F) L'oxydation du NADPH (ligne en pointillé) et la réduction du cytochrome c (ligne pleine) ont été suivies simultanément à 340 nm et 550 nm, respectivement.

Avec ses six segments transmembranaires nous avons été obligés de solubiliser et de purifier SpNOX avec des détergents. Ceux de la famille des maltosides ont permis de conserver la protéine sous sa forme active. SpNOX a une affinité plus faible pour le NADPH et la FAD (K_m de 8 μM et 0,13 μM) que NOX2 (K_m de 25-50 μM et 1 nM)⁹²⁻⁹⁴. Elle présente également une activité spécifique de 19 mol $\text{O}_2^{\cdot-}$ /mol SpNOX/s, ce qui représente 30 % de celle rapportée pour NOX2, qui est de 64 mol $\text{O}_2^{\cdot-}$ /mol Cyt b/s⁸⁴. À l'inverse, SpNOX a environ deux fois l'activité spécifique estimée de NOX4⁹⁵. La stœchiométrie de la réaction a été établie en suivant simultanément l'oxydation du substrat et la réduction du cytochrome c (Figure 18C). Une molécule de NADPH devrait être capable de transférer deux électrons, produisant en fin de compte deux ions superoxyde. D'après les cinétiques présentées dans la Figure 18C, nous avons obtenu entre 1,4 et 1,6 molécules de cytochrome c réduites par NADPH oxydé. Ce ratio se compare bien à la valeur maximale théorique de 2, le déficit s'expliquant par une récupération incomplète d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par le cytochrome c⁵⁸. De plus, la substitution des ligands His de l'hème dans

les variantes H69A-H129A et H83A-H142A a abouti à des protéines affichant le même niveau d'activité basale que la fraction membranaire d'*E. coli* transformée avec le vecteur d'expression vide. Ainsi, l'activité NADPH oxydase observée chez SpNOX dépend du transfert d'électrons via les groupes hèmes et, par conséquent, elle n'est pas due à une perte d'électrons au niveau du domaine FNR de SpNOX.

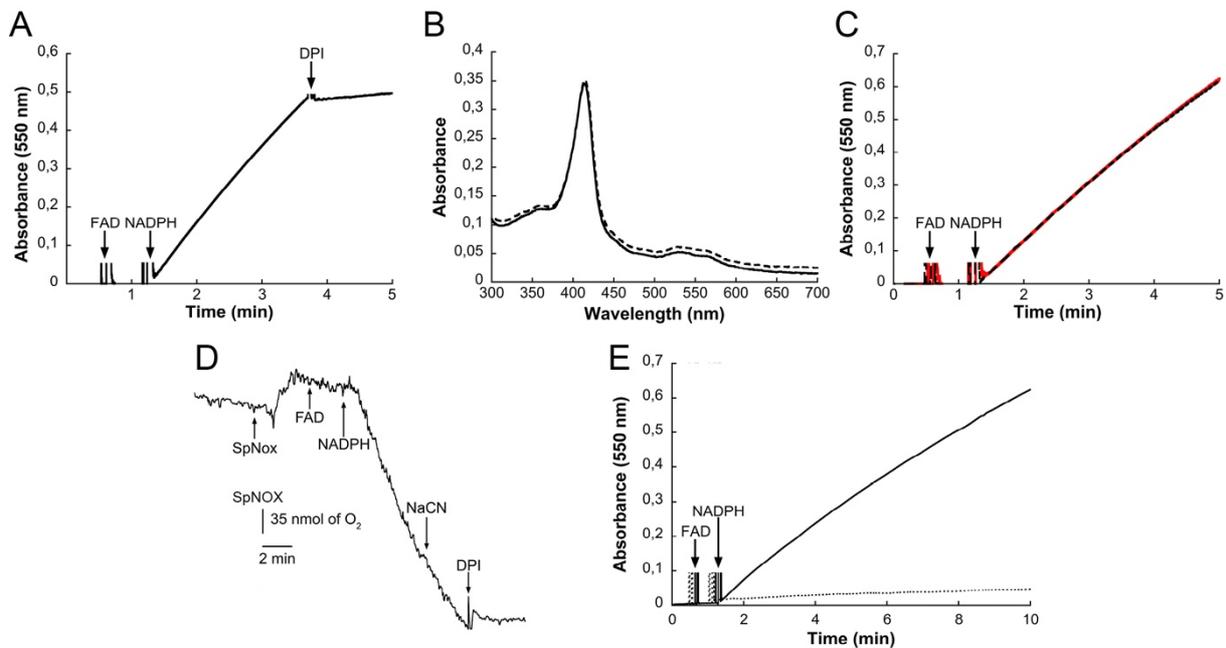


Figure 19 : Activité NOX de SpNOX. A) Les activités de SpNOX ont été mesurées après l'ajout de NADPH et de FAD à des concentrations finales respectives de 200 μ M et 10 μ M. L'activité enzymatique a été inhibée par l'ajout de 50 μ M de DPI (flèche). B & C) Spectres contenant un pic Soret de SpNOX avant (ligne pleine) et après addition de cyanure (ligne en pointillé). Comme chez les NOX eucaryotes, le cyanure n'a aucun effet sur l'activité enzymatique de SpNOX. D) Cinétiques de la consommation d'oxygène insensible au cyanure par SpNOX. Seul le DPI inhibe ce processus. E) La réduction du fer ferrique (ligne en pointillé) a été inhibée par l'ajout de 0,4 mg/mL de superoxyde dismutase (SOD).

Toujours dans l'idée de démontrer le fait que SpNOX est une NOX, nous avons utilisé le diphénylène iodonium (DPI) qui est connu pour inhiber les flavoenzymes telles que NOX2 et est largement utilisé comme inhibiteur commun des enzymes NOX. L'ajout de DPI a immédiatement arrêté la réaction (Figure 19A). De même, le cyanure est connu pour être un inhibiteur global des hémoprotéines grâce à sa liaison axiale à l'ion fer. Contrairement à cette règle générale, les enzymes NOX y sont insensibles. Cette caractéristique représente un marqueur distinctif des protéines NOX où les deux hèmes sont hexacoordonnés⁴⁶. Nous avons également évalué cette propriété pour SpNOX en utilisant la catalase comme contrôle positif. Alors que l'incubation au cyanure induisait un décalage de la bande Soret à 417 nm de la catalase, aucune modification n'a été observée dans le spectre de SpNOX après l'ajout de NaCN

(Figure 19B). De plus, son activité NADPH oxydase était identique avec ou sans cyanure ou azoture ajouté (Figure 19C). Enfin, la consommation d'oxygène dépendante de SpNOX, mesurée à l'aide d'une électrode Clark (Figure 19D), confirme son insensibilité à l'ajout de NaCN. Ensemble, ces données montrent que les électrons transférés du NADPH aux groupes hème via le FAD peuvent utiliser l'oxygène moléculaire comme accepteur final. Cette activité, associée à la sensibilité au DPI et à la résistance au cyanure décrites ci-dessus, indique la parenté structurale et fonctionnelle de SpNOX avec la famille NOX eucaryote des NADPH oxydases. Au sein de la famille globale des enzymes NOX/FRE qui possèdent des domaines FRD et FNR, une distinction, basée sur l'accepteur final d'électrons, est souvent faite entre les enzymes NOX/DUOX, capables d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons et les enzymes FRE qui réduisent directement le fer. SpNOX n'est pas capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} en présence de SOD (Figure 19E). Cela montre que l'activité réductase ferrique observée de SpNOX est due aux ions superoxyde produits qui, à leur tour, sont capables de réduire le fer ferrique. L'activité spécifique a été estimée à 7,9 moles de Fe^{3+} réduit/mol SpNOX/s, ce qui représente 32 % de l'activité réductase ferrique de NOX2. En effet, la même expérience a été réalisée en utilisant le cytochrome b558 humain et l'activité spécifique a été calculée à 24 moles de Fe^{3+} réduit/mol Cyt b/s. **Ainsi, SpNOX est un bon modèle pour étudier l'état activé d'une enzyme de type NOX2 des mammifères.**

Un outil pour le haut-débit

Les données ainsi obtenues ont permis de développer deux prototypes en plaque 96 et 384 puits (Figure 20A) pour tester l'intérêt d'utiliser SpNOX dans un criblage primaire afin de sélectionner des familles de molécules avant un criblage secondaire sur les cibles humaines. Pour cela nous avons aussi bien travaillé sur la miniaturisation des tests que sur la diversification des modes de détection de ces mêmes tests. En effet, il est apparu important de proposer d'autres modes de détection que la colorimétrie pour deux raisons principales. La première est que beaucoup de molécules présentent dans les banques sont-elles même colorées ce qui n'est pas compatible avec notre premier mode de lecture. La seconde raison est que beaucoup de ces mêmes composés ont des propriétés de fluorescence. Nous étions donc dans l'obligation de croiser les solutions avec le développement d'une détection par colorimétrie mais aussi par fluorescence et par chimiluminescence. Nous avons nous-même eu le cas lors de nos phases de criblage avec un inhibiteur des NOX eucaryotes connu sous le nom de ML171. Cette molécule est naturellement colorée en orange. Tous les tests réalisés en colorimétrie ont montré une absence totale d'inhibition du ML171 sur la protéine SpNox. En revanche, les

mêmes tests réalisés avec des concentrations similaires en inhibiteur mais avec un mode de lecture en fluorescence ont fait apparaître que le ML171 était bien un inhibiteur de l'activité NADPH oxydase de la protéine *SpNox* (Figure 20B).

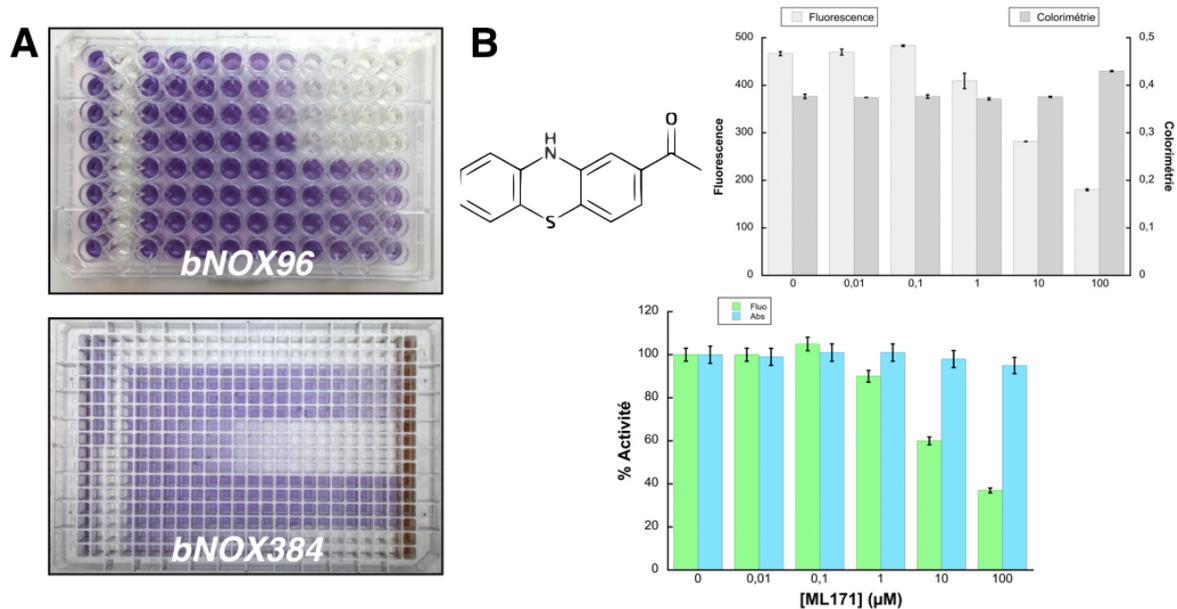


Figure 20 : A) Plaque moyen débit en 96 puits (bNOX96) et à haut débit en 384 puits (bNOX384) avec un mode de détection par colorimétrie. Plus le puits est violet et plus la protéine *SpNox* produit d'ions superoxyde et donc, moins elle est inhibée. B) Molécule ML171 dont les propriétés spectrales empêchent la détection de l'inhibition par colorimétrie. Que la lecture soit directe par fluorescence ou colorimétrie ou interprétée après calcul des activités spécifiques, le résultat montre que seule la fluorescence peut permettre d'identifier le ML171 comme un inhibiteur de *SpNox*.

Ainsi nous avons développé 8 tests capables de répondre aux besoins des industriels :

- bNOX96* colorimétrie (molécule réactive NBT) ;
- bNOX96* colorimétrie (molécule réactive cytochrome *c*) ;
- bNOX384* colorimétrie (molécule réactive NBT) ;
- bNOX384* colorimétrie (molécule réactive cytochrome *c*) ;
- bNOX384* chimiluminescence (MCLA – spécificité aux ions superoxydes) ;
- bNOX384* chimiluminescence (HyPerBlu – spécificité au peroxyde d'hydrogène) ;
- bNOX384* chimiluminescence (Luminol – peu coûteux mais pas spécifique) ;
- bNOX384* fluorescence (molécule réactive Amplex Red).

Une petite campagne de criblage a pu être effectuée en 2015 afin de vérifier la robustesse de ces tests et leur éventuelle transférabilité vers le monde industriel. Les résultats ont été concluants.

Conclusion personnelle

L'ensemble des résultats obtenus ainsi que les premiers clichés de diffraction à 10Å permettront d'aboutir à la résolution de la structure de SpNOX même si je n'y participerai pas directement. En effet, en juillet 2017, je décide de quitter l'équipe dans laquelle je suis depuis mon recrutement. Je finirai de porter l'ANR que j'ai obtenu sur le sujet des NOX bactérienne et je basculerai définitivement sur une nouvelle thématique dès juillet 2021. La conclusion de cette aventure se résumera tout de même à l'identification de la première NOX bactérienne, même si plusieurs années après les mentalités n'ont pas vraiment évolué sur la question. Les dogmes sont tenaces, même en Science.

Les résultats que j'obtiendrai pendant ces 6 années me permettront d'obtenir quatre articles^{58,90,96,97} et un brevet international⁹⁸. Je publierai avec un de mes étudiants en Master 2 mais surtout avec Christine Hajjar, l'étudiante en thèse avec qui j'ai travaillé quotidiennement pendant plus de 3 ans. Je signerai cet article⁹⁰ en dernier auteur et je coordonnerai aussi toute l'écriture du brevet international ainsi que toutes les phases nationales qui en découleront et sur lequel Christine sera aussi « inventeur ».

LE GROUPE SYNCHROTRON

Pour faire de la biologie structurale, et qui plus est de la cristallographie des protéines, il faut un environnement entièrement dédié à cela. Mon changement d'équipe répondait à cette envie pour moi de retrouver ce champ méthodologique que j'ai choisi en thèse et qui m'avait accompagné jusqu'à mon recrutement. Si l'environnement est important, la thématique est cruciale. En cela, j'étais donc prêt à quitter celui des métalloprotéines et c'est pourquoi, depuis maintenant réellement 3 ans, je découvre le monde des protéines fluorescentes. En cela, je peux largement compter sur la présence de mon responsable de groupe, Antoine Royant, qui est un expert du domaine, reconnu aussi bien nationalement qu'internationalement et je l'en remercie profondément.

2 publications (Nature Methods 2023 / PEDS 2022) ;

Sur la période considérée, j'ai supervisé le travail de 10 collaborateurs dont 1 étudiant en thèse avec qui je travaille toujours car il termine sa 2eme année de doctorat, 1 post-doctorant, 1 ATER dont j'ai obtenu pendant 2 ans le financement, 1 assistante ingénieure financée encore pour 2 ans et de nombreux étudiants en master et licence.

« Compréhension structurale de l'efficacité de la fluorescence dans les protéines fluorescentes de véritables lampes de poche moléculaires. » Institut de Biologie Structurale – Groupe Synchrotron (GSY) – Grenoble.

Depuis novembre 2017

Introduction

Des dizaines de milliers de structures protéiques ont été résolues et leurs dynamiques fonctionnelles ont été minutieusement étudiées grâce à diverses méthodes biochimiques et biophysiques. Toutefois, comprendre pleinement la fonction des protéines nécessite plus que des études in vitro et structurales. Dans l'environnement cellulaire, les protéines interagissent avec de multiples molécules, se répartissent dans différents compartiments cellulaires et sont parfois associées aux structures cytosquelettiques et membranaires. Elles peuvent également être modifiées et se déplacer dans la cellule par diffusion ou transport actif, ce qui peut être crucial pour leur fonction. C'est pourquoi de nombreux biologistes travaillent sur les

interactions entre biomolécules et les processus fonctionnels correspondant à l'échelle cellulaire, tissulaire ou organique, à travers le temps et l'espace.

La microscopie optique de fluorescence est la technique privilégiée pour ces approches. Cette méthode peu invasive permet d'observer les processus au sein de cellules et de tissus vivants sur de longues durées et offre une sensibilité exceptionnelle, au niveau parfois de la molécule unique, avec une résolution d'image remarquable. Cette technique permet de visualiser des processus fonctionnels spécifiques en fixant des fluorophores sur les molécules ou sur d'autres structures d'intérêt telles que les membranes, les organites ou les cellules. Si à l'instar des fluorophores de nature chimique, les protéines fluorescentes peuvent être utilisées pour étudier des fonctions biologiques sur des cellules ou tissus fixés elles ont surtout l'immense avantage de permettre des mesures dynamiques sur des cellules en culture, des tissus ou des organismes vivants.

La fluorescence

Il y a trois types principaux de luminescence : la fluorescence, la phosphorescence et la chimiluminescence. La fluorescence et la phosphorescence, deux formes de photoluminescence, sont activées par la lumière, tandis que la chimiluminescence résulte d'une réaction chimique. La fluorescence émet rapidement (<10 ns) de la lumière lorsque exposée à une source lumineuse, comme les lampes UV et cesse lorsque la lumière s'éteint. La phosphorescence, en revanche, peut emmagasiner l'énergie lumineuse et la libérer progressivement, permettant une lueur qui persiste après que la source de lumière soit éteinte, durant de quelques millisecondes à plusieurs heures.

La fluorescence nécessite que les molécules absorbent la lumière pour atteindre une excitation électronique. Quand un électron dans une molécule capte un photon, il s'excite en passant de son état fondamental (S_0) à un état excité (S_n) presque instantanément. L'excitation peut se produire à différents niveaux vibrationnels ($v=n$), selon la longueur d'onde du photon absorbé. Ces états excités sont généralement instables et les électrons reviennent à leur état de base en suivant plusieurs étapes mécaniques, dissipant l'énergie de diverses façons (Figure 21). La relaxation vibrationnelle, qui se produit entre 10^{-12} et 10^{-10} secondes, permet de dissiper l'énergie d'un état excité en la convertissant en chaleur transmise aux molécules avoisinantes, sans émission de lumière, donc par un processus non radiatif. La conversion interne, un autre processus non radiatif et isoénergétique, survient entre 10^{-14} et 10^{-11} secondes. Elle correspond à la transition d'un état excité supérieur (S_{n+1}) vers un état vibrationnel inférieur (S_n) sans perte d'énergie. L'énergie absorbée peut être entièrement dissipée par la relaxation vibrationnelle et la conversion interne, résultant en une absence totale de fluorescence, toute l'énergie étant

libérée sous forme de chaleur. Le rapport entre les événements radiatifs et non radiatifs détermine le rendement quantique d'un fluorophore, et par conséquent, son intensité lumineuse.

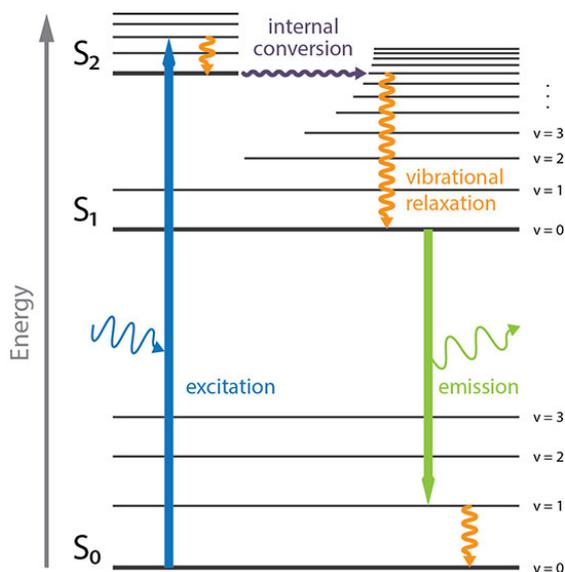
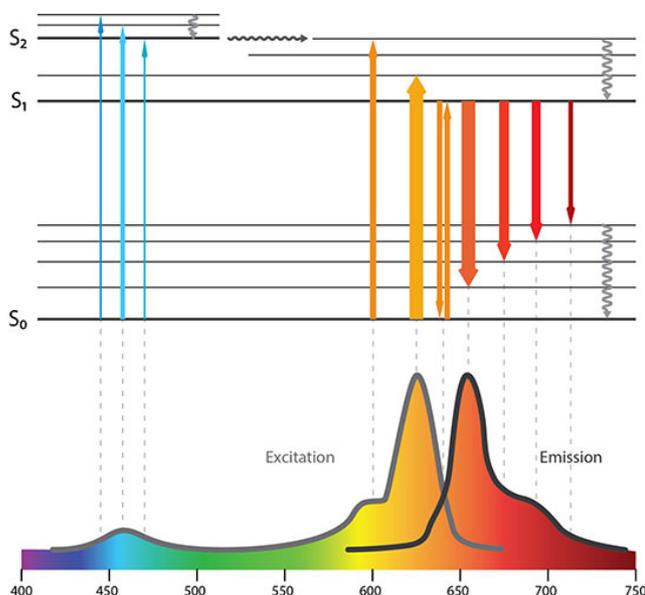


Figure 21 : Diagramme simplifié de Jablonski de la fluorescence. Un électron est excité en absorbant un photon d'une certaine longueur d'onde. Il se détend vers les niveaux sans vibration de l'état excité le plus bas (S₁) à travers une série de transitions non radiatives (relaxation vibrationnelle et conversion interne). Une détente supplémentaire vers l'état fondamental (S₀) par fluorescence entraîne l'émission d'un photon de plus faible énergie et de plus grande longueur d'onde que le photon exciteur.

Durant l'émission, l'électron peut se relaxer vers divers niveaux vibrationnels (v=n) de l'état fondamental (S₀), produisant une variété de longueurs d'onde possibles pour le photon émis. De plus, avant que la fluorescence se produise, les électrons perdent généralement de l'énergie jusqu'à atteindre le niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité par des transitions non radiatives, rendant la longueur d'onde de l'émission indépendante de la longueur d'onde d'excitation.

Figure 22 : Diagramme simplifié de Jablonski pour les événements représentatifs d'excitation et d'émission définissant les spectres de fluorescence d'une molécule. La probabilité que les événements d'excitation et d'émission se produisent à différentes longueurs d'onde (représentée par la largeur des flèches) définit les spectres de fluorescence d'une molécule.



Ce phénomène, connu sous le nom de décalage de Stokes, dépend de la manière dont la molécule dissipe l'énergie d'excitation de façon non radiative. Les spectres d'excitation et d'émission, qui définissent les longueurs d'onde qu'une molécule peut absorber et celles qu'elle peut émettre, sont souvent miroirs l'un de l'autre à cause des transitions électroniques similaires impliquées dans les deux processus.

Les protéines fluorescentes (PF)

Tout a commencé en 1962 avec la découverte de la GFP (Green Fluorescent Protein) par Osamu Shimomura⁹⁹ alors que ce dernier travaillait sur l'aequorine. Il a isolé cette protéine qui émettait une lumière verte et brillante sous l'effet de la lumière UV, bien que paraissant jaune sous lumière artificielle. Dans les années 1990, la GFP a gagné en popularité grâce à Douglas C. Prasher qui clonera le gène de la GFP¹⁰⁰ et Martin Chalfie, qui exprimera la GFP dans le nématode *Caenorhabditis elegans* afin de visualiser l'expression des gènes en temps réel et la localisation de protéines dans les cellules vivantes¹⁰¹. Cette approche a démontré que la GFP pouvait être utilisée sans aucune des enzymes spécifiques de la méduse *Aequorea victoria*, simplifiant ainsi son application dans d'autres systèmes biologiques. Finalement, Roger Tsien a joué un rôle déterminant dans l'amélioration des propriétés de la GFP, en développant des variantes avec des couleurs d'émission différentes, de meilleures caractéristiques de fluorescence et un spectre d'excitation simplifié. Ces variantes ont permis des applications plus larges de la GFP, notamment en imagerie cellulaire et moléculaire¹⁰². La GFP et ses mutants ont ouvert la voie pour l'ingénierie de nombreuses autres protéines fluorescentes encodées génétiquement bien au-delà du seul groupe des protéines associées à la GFP (Figure 23)¹⁰³.

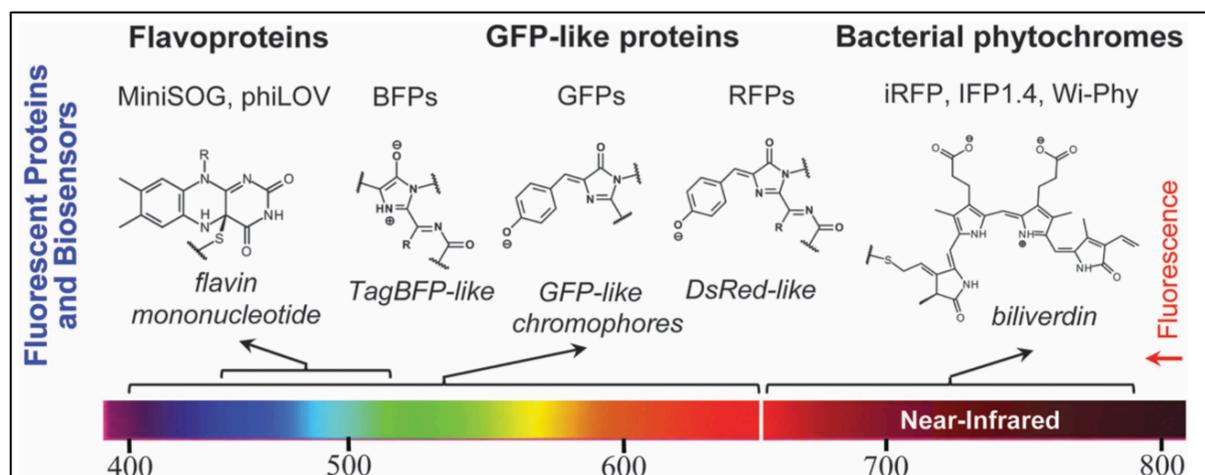


Figure 23 : représentation de la diversité des chromophores dans les principaux groupes de protéines fluorescentes et de biocapteurs fluorescents développés pour des applications biotechnologiques. La figure montre les structures chimiques des mononucléotides de flavine (biocapteurs MiniSOG, phiLOV), des chromophores de type GFP (BFPs, GFPs, RFPs) et de la biliverdine pour les protéines fluorescentes dérivées de phytochromes bactériens (iRFP, IFP1.4, Wi-Phy). Les chromophores sont représentés sous leur forme liée aux protéines. Une échelle de couleurs présente la gamme de longueurs d'onde de l'émission de fluorescence pour les protéines fluorescentes et les biocapteurs.¹⁰⁴

Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien obtiendront le prix Nobel de Chimie en 2008 pour leurs travaux sur la GFP. Douglas C. Prasher n'a pas été associé à ce prix Nobel malgré le travail considérable qui a été le sien, en particulier sur le clonage et le séquençage de la GFP. La fin de ses financements de l'*American Cancer Society* l'a poussé à quitter la recherche. Il n'y reviendra qu'en 2010 avant de rejoindre le laboratoire de Roger Tsien en 2012.

Les projets

mNeonGreen & NeonCyan¹⁰⁵

La majorité des informations structurales connues sur les protéines fluorescentes a été obtenue pour des protéines d'organismes marins du phylum des cnidaires (*Cnidaria*), méduses, coraux et anémones de mer. Après la résolution des structures cristallographiques de la GFP d'*Aequorea victoria* (avGFP dont le chromophore est constitué par 3 acides aminés cyclisés Ser-Tyr-Gly) et de AvGFP-S65T en 1996 plus de 500 structures de PF de cnidaires ont été résolues. Depuis, de nombreuses PF ont été identifiées dans de nouveaux organismes d'autres phylums et il est maintenant important de pouvoir identifier de nouveaux déterminants structuraux de fluorescence afin de proposer de nouvelles pistes pour l'évolution dirigée.

Les protéines fluorescentes provenant de vers marins du genre *Branchiostoma* (phylum *Chordata*) ont suscité un fort intérêt au début des années 2010, et Nathan Shaner (Scintillon Institute, San Diego, USA) a développé une nouvelle protéine fluorescente particulièrement brillante et monomérique, mNeonGreen¹⁰⁶, à partir de la protéine *lanYFP* provenant de *B. lanceolatum*. Les premiers résultats structuraux ont été obtenus au début des années 2010¹⁰⁶⁻¹¹¹. Les PF de chordés présentent très majoritairement un chromophore de type Gly-Tyr-Gly. La résolution des structures de PF de *B. lanceolatum* (*lanGFP*, *lanRFP* et *lanRFP-Y62S*, ces deux dernières étant des PF rouges) mais aussi de *B. floridae* (*bfloGFP-c1* et *bfloGFP-a1*, PF vertes) a permis de rationaliser les clés structurales qui gouvernent les processus de fluorescence, tout particulièrement pour le processus d'évolution de la PF jaune-vert monomérique mNeonGreen à partir de la PF sauvage jaune LanYFP tétramérique.

Sur l'assise de cette nouvelle protéine aux propriétés de brillance inégalées, Robert Campbell cherche à aller plus loin en développant une nouvelle famille de protéines cyan potentiellement plus brillantes que celles déjà existantes, et donc particulièrement adaptées aux applications d'imagerie sur cellules vivantes utilisant la technique du FRET. Pour ce faire, il a introduit le résidu tryptophane au sein de chromophore, ce qui a mené au variant NeonCyan1, avec un chromophore similaire à celui des protéines fluorescentes de couleur cyan (CFP) avec un chromophore de type Gly-Trp-Gly au lieu de Gly-Tyr-Gly. Il développera aussi deux mutants

de NeonCyan1 (NeonCyan1-T207D et NeonCyan1-T207M) avec des couleurs spectrales étonnamment distinctes, car les CFP dérivées de la GFP d'*A. victoria* montrent une insensibilité du pic d'émission en fonction des mutations au voisinage du chromophore.

Nous avons déterminé les structures de NeonCyan0.95 à pH physiologique (pH 7,5) et acide (pH 5,6) ainsi que celle de NeonCyan1-T207D à pH 6,5. Nous n'avons pas été en mesure d'obtenir celles de NeonCyan1 ni de NeonCyan1-T207M mais chacune des trois structures résolues nous a fourni des informations importantes quant à la compréhension des propriétés biophysiques de ces protéines. NeonCyan0.95 (pH 7,5) a permis de comprendre les interactions mises en jeu dans la dimérisation de la protéine ainsi que d'observer la présence d'un réseau de liaisons hydrogène ponté par 2 molécules d'eau s'étendant de l'azote du noyau indole du chromophore au groupe hydroxyle de Thr207. Cette thréonine a donc été étudiée et cela a conduit à l'obtention d'un mutant décalé vers le rouge NeonCyan1-T207D et d'un autre vers le bleu NeonCyan1-T207M (Figure 24)¹⁰⁵.

Les changements observés au niveau du chromophore de NeonCyan0.95 en fonction du pH suggère aussi un lien avec la protonation de la Glu220. La structure de NeonCyan1-T207D à pH 6,5 a révélé un déplacement des molécules d'eau proche du chromophore entraînant un changement dans l'état d'ionisation et a mis en lumière le rôle de l'Asp207 dans le *red shift* observé.

Par rapport à NeonCyan1, NeonCyan1-T207M est décalé vers le bleu d'environ 20 nm. L'absence de structure ne nous permet pas d'avoir d'explication claire quant à ce qui se passe au niveau du chromophore mais nous pouvons avancer une hypothèse sur la base de la présence du résidu méthionine, volumineux et apolaire, qui peut forcer le chromophore à passer au stéréoisomère Z,E. La configuration Z,E est associée à un profil spectral décalé vers le bleu pour un chromophore neutre¹¹². De plus, le stéréoisomère Z,E du chromophore est une caractéristique couramment observée dans les CFP avec des chromophores dérivés de Xaa-Trp-Gly à des pH plus bas.

Comparée aux variantes contemporaines de CFP telles que mCerulean3 et mTurquoise2, NeonCyan1 a des maxima d'excitation et d'émission similaires et un coefficient d'extinction similaire. Cependant, le rendement quantique de fluorescence de NeonCyan1 est nettement inférieur à ceux de mCerulean3 et mTurquoise2 (0,29 contre 0,87 et 0,93 respectivement). La brillance nettement inférieure de NeonCyan1 par rapport aux CFP contemporains dérivés de l'avGFP est particulièrement décevante, en vue des attentes soulevées par l'utilisation du gabarit structural de mNeonGreen. Sur la base des structures que nous avons obtenues, nous avons

émis l'hypothèse que le faible rendement quantique de NeonCyan1 et NeonCyan1-T207D est lié à la non-coplanarité entre les anneaux imidazolinone et indole du chromophore.

En conclusion, nous avons caractérisé en détail trois variants de mNeonGreen qui partagent tous un chromophore de type Gly-Trp-Gly. Ce travail a permis de fournir des informations sur les interactions qui influencent les propriétés de ce type de chromophore et révèle qu'il est possible de produire des variants de couleur pour un type de chromophore essentiellement insensible dans le gabarit de l'AvGFP. Bien que prometteuses pour cet aspect, ces nouvelles protéines n'ont pas la brillance souhaitée et il serait nécessaire de faire de l'ingénierie afin de produire des protéines plus brillantes, monomériques et photostables.

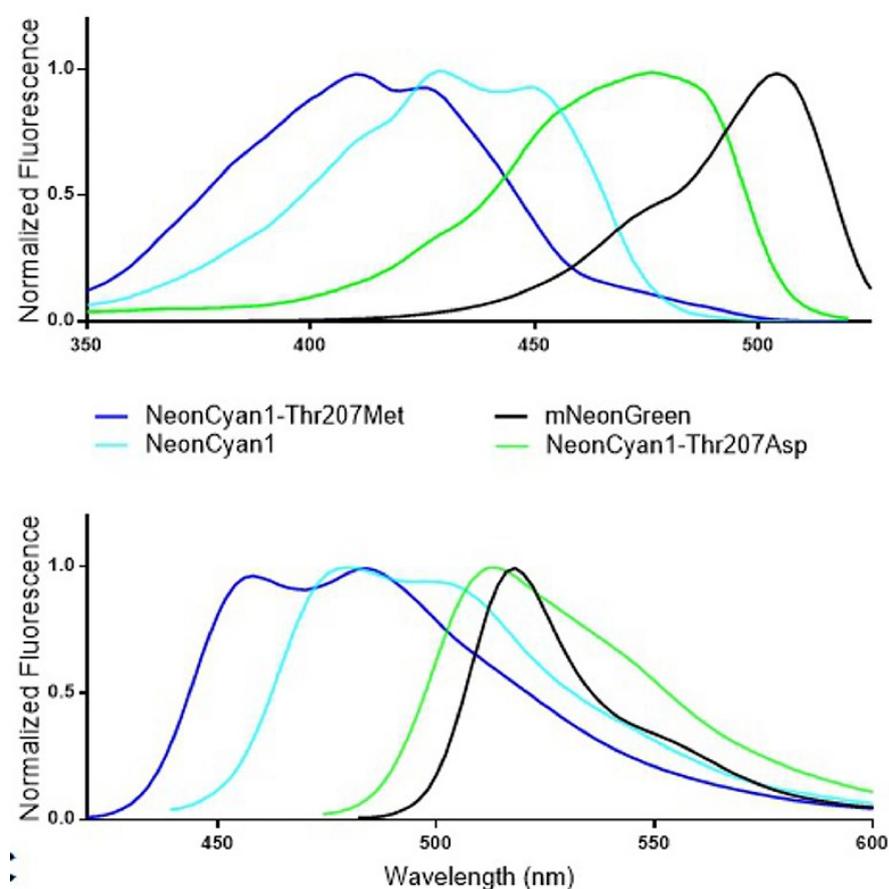


Figure 24 : caractérisation spectrale de NeonCyan1 et de ses variants. Spectres d'excitation (en haut) et d'émission (en bas) de NeonCyan1, NeonCyan1-T207M, NeonCyan1-T207D et mNeonGreen.

mScarlet¹¹³ et mScarlet3¹¹⁴

Comme évoqué plus haut, le clonage de la GFP et le développement de plusieurs variants ont permis de créer une palette de couleurs allant du vert au jaune en passant par le bleu et le cyan. La découverte de protéines fluorescentes rouge (RFP) dans les coraux (anthozoaires de la classe des cnidaires) a permis de considérablement élargir le champ des possibles en termes de couleur de fluorescence. Cependant, toutes ces RFP forment des tétramères ce qui peut sérieusement

interférer avec la localisation et le fonctionnement des protéines de fusion RFP. La monomérisation de ces RFP s'est accompagnée d'une détérioration significative de leur niveau de fluorescence. Après le développement de la première RFP monomérique (mRFP), mRFP1, plusieurs améliorations ont permis de développer de nouvelles protéines : mCherry, mApple, TagRFP(-T), mKate2, mRuby2, mRuby3 et FusionRed mais toutes ces protéines sont moins brillantes que leurs ancêtres tétramériques. De plus, elles ont des rendements quantiques inférieurs à 50 % et plusieurs présentent encore des problèmes supplémentaires dus à une maturation incomplète ou partielle et à une tendance résiduelle à la dimérisation.

Plutôt que d'évoluer à partir d'un ancêtre naturel tétramérique, nos collaborateurs ont identifié une séquence consensus aux RFP pour commencer le développement d'une nouvelle RFP monomérique à partir d'un gène synthétique. Basé sur les connaissances acquises avec mCherry et d'autres RFP, ils ont choisi les résidus de surface afin d'empêcher la dimérisation. Un gros travail de mutagenèse multi-sites puis aléatoire a permis d'aboutir à trois RFP monomériques avec des propriétés distinctes : une mRFP très lumineuse avec un rendement quantique élevé appelée mScarlet et deux variantes avec une seule substitution d'acide aminé, appelées mScarlet-I et mScarlet-H. mScarlet présente la plus grande brillance intrinsèque (multiplication du coefficient d'extinction et du rendement quantique), aucune photochromicité et est monomérique, mais sa maturation est relativement lente. mScarlet-I, avec une brillance intrinsèque inférieure, est plus lumineuse dans les cellules grâce à une maturation plus rapide et plus complète.

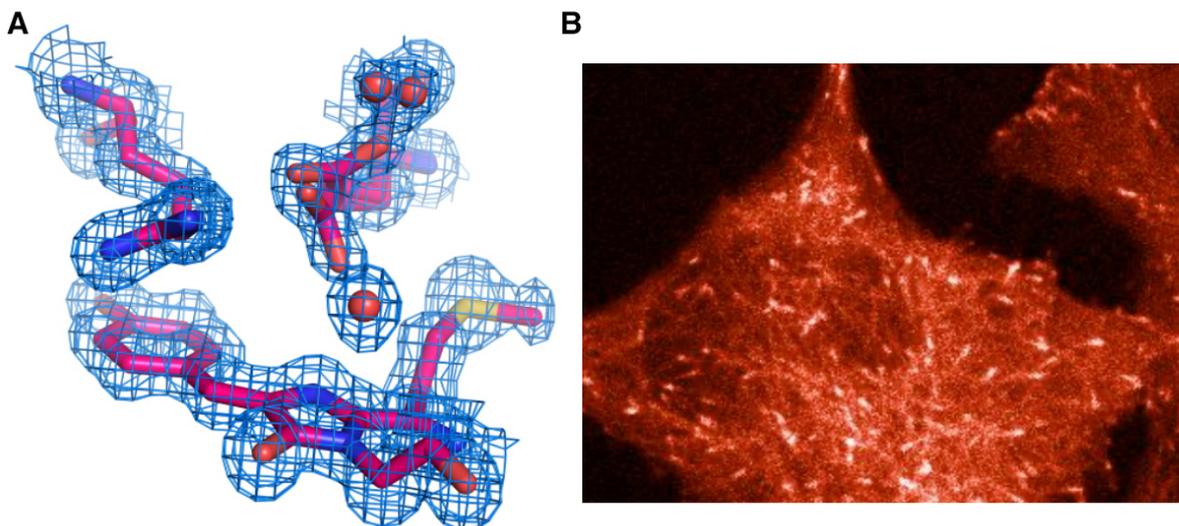


Figure 25 : A) Structure du chromophore de mScarlet3 déterminée par cristallographie aux rayons X. B) Visualisation de la polymérisation des microtubules d'une cellule HeLa grâce à un marquage avec mScarlet3.

Étant donné que la mutagenèse aléatoire pour créer des variantes de mScarlet plus brillantes s'est avérée infructueuse, nos collaborateurs ont ciblé les acides aminés entourant la thréonine 74. En effet, la Thr74 est le seul acide aminé muté dans mScarlet-I par rapport à mScarlet. Après plusieurs cycles de mutagenèse ciblée et aléatoire, ils ont généré finalement deux nouvelles protéines, mScarlet3 et mScarlet-I3 (Figure 25)¹¹⁴.

L'évaluation spectroscopique de mScarlet3 purifiée a révélé un rendement quantique de 75 %, un coefficient d'extinction de $104\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ et une longue durée de vie de fluorescence de 4 ns. mScarlet-I3 a un rendement quantique amélioré (65 %) et une brillance intrinsèque augmentée de 21 % par rapport à mScarlet-I, approchant celle de mScarlet (95 %). Cependant, la brillance intrinsèque des protéines fluorescentes purifiées ne reflète pas toujours la luminosité réelle observée dans les cellules, car cette dernière dépend également de l'étendue et de la rapidité de la maturation du chromophore. Ainsi, dans les cellules, mScarlet3 et mScarlet-I3 sont respectivement 76 % et 80 % plus brillantes que mScarlet et plus de cinq fois plus brillantes que mCherry, en raison d'une maturation substantiellement plus rapide et plus complète.

En comparant directement la brillance intrinsèque avec la brillance cellulaire, il est possible de déduire l'étendue de la maturation. Après 24 heures, mScarlet3 a une maturation très similaire à celle de mScarlet-I (96 %) alors que mScarlet-I3 est plus complète (113 %). mScarlet3 mature quatre fois plus rapidement que mScarlet. mScarlet-I3 est, jusqu'à présent, la RFP monomérique la plus rapide à maturer. À noter, dans des expériences de dénaturation alcaline, nous avons constaté une stabilité stupéfiante de mScarlet3 : là où mScarlet et mScarlet-I se dénaturent instantanément (<1 s) à pH 13,5, mScarlet3 conserve plus de la moitié de sa fluorescence initiale pendant plus de 40 minutes. mScarlet3 ($pK_a = 4,5$) et mScarlet-I3 ($pK_a = 4,2$) ont une meilleure résistance à l'acide par rapport à mScarlet(-I) ($pK_a = 5,4$), ce qui serait bénéfique pour les applications de ces RFP dans les études sur les endomembranes (Figure 26).

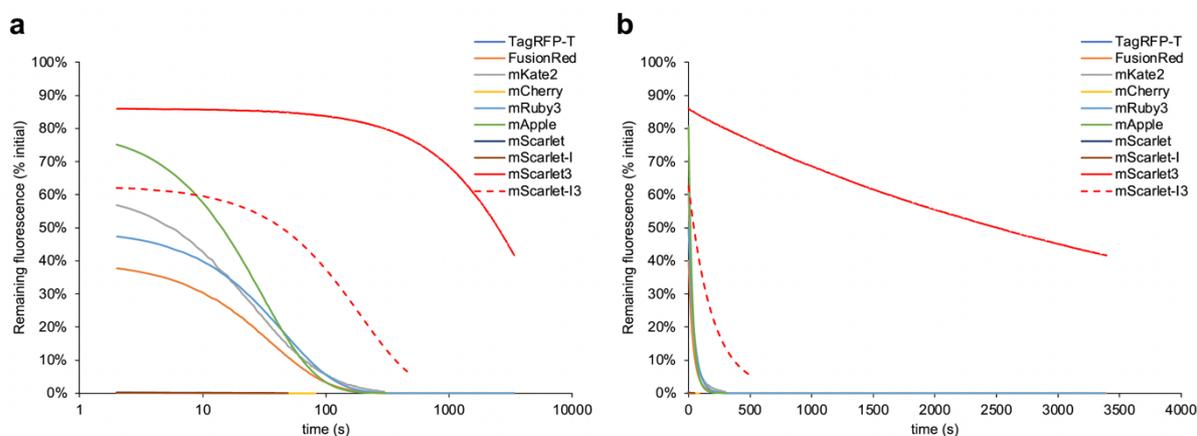


Figure 26 : Vitesse de dénaturation alcaline de diverses RFP purifiées à pH 13,5. A) axe des temps logarithmiques, B) axe des temps normaux.

Afin de comprendre ces améliorations, nous avons déterminé la structure de mScarlet3 à pH physiologique et à une résolution de 1,33 Å. Les conformations du chromophore et de ses résidus environnants (première sphère de coordination) sont parfaitement superposables à celles observées dans la structure cristalline de mScarlet à pH 7,8. Cependant, le résidu clé Glu216 adopte deux conformations alternées, comme dans la protéine fluorescente verte brillante eGFP (enhanced GFP). Nous avons concentré notre analyse sur les mutations au sein du cœur du tonneau protéique : Y84W, Y194F, V196I et G220A. De façon remarquable, ces quatre mutations retirent deux atomes polaires et ajoutent six atomes non polaires dans cette zone, ce qui se traduit par le remplacement d'une petite cavité amphipathique par une zone hydrophobe impliquant uniquement des atomes de carbone méthyle ou méthine. Cette zone hydrophobe relie les extrémités de 4 des 11 brins β de la protéine et de l'hélice α portant le chromophore, ainsi qu'une boucle et une hélice reliant des paires de brins. Cela contribue ainsi à la rigidification accrue d'une extrémité du tonneau β , probablement à l'augmentation du rendement quantique de fluorescence de mScarlet3 et très certainement à sa résistance étonnante aux dénaturations alcaline et acide.

En conclusion, mScarlet3 combine le rendement quantique le plus élevé des RFP, un comportement monomérique, aucune cytotoxicité apparente et l'absence de comportement photochromique avec une maturation rapide et complète. Dans toutes les fusions testées, mScarlet3 a démontré d'excellentes performances en tant qu'étiquette de fusion, accepteur FRET et dans les applications en cellules vivantes. Bien que la rigidité du chromophore soit essentielle pour un rendement quantique élevé, une rigidité excessive peut entraver la maturation des protéines fluorescentes, qui nécessite un certain degré de flexibilité interne pour favoriser la cinétique rapide de formation et d'oxydation du chromophore.

La suite

Les protéines fluorescentes de type GFP fonctionnent bien pour l'imagerie de cellules vivantes en microscopie à épifluorescence. Cependant, elles montrent des limites dans l'imagerie des tissus et du corps entier, en raison de l'absorption considérable de la lumière par l'oxy- et la désoxyhémoglobine en dessous de 660 nm, mais aussi de manière significative au-dessus de 900 nm, où l'absorption (ou la diffusion) par l'eau entre également en jeu (Figure 27). Par conséquent, la région [650 nm - 900 nm] du spectre lumineux est considérée comme la "fenêtre optique des tissus", c'est-à-dire la gamme de longueurs d'onde des photons qu'il est préférable d'utiliser pour sonder les tissus.

Pour l'imagerie de fluorescence, cela signifie que les maxima d'excitation et d'émission du, ou des chromophores utilisés doivent se situer dans cette plage, qui se trouve essentiellement dans la partie proche infrarouge (NIR) du spectre lumineux [700 nm - 1400 nm].

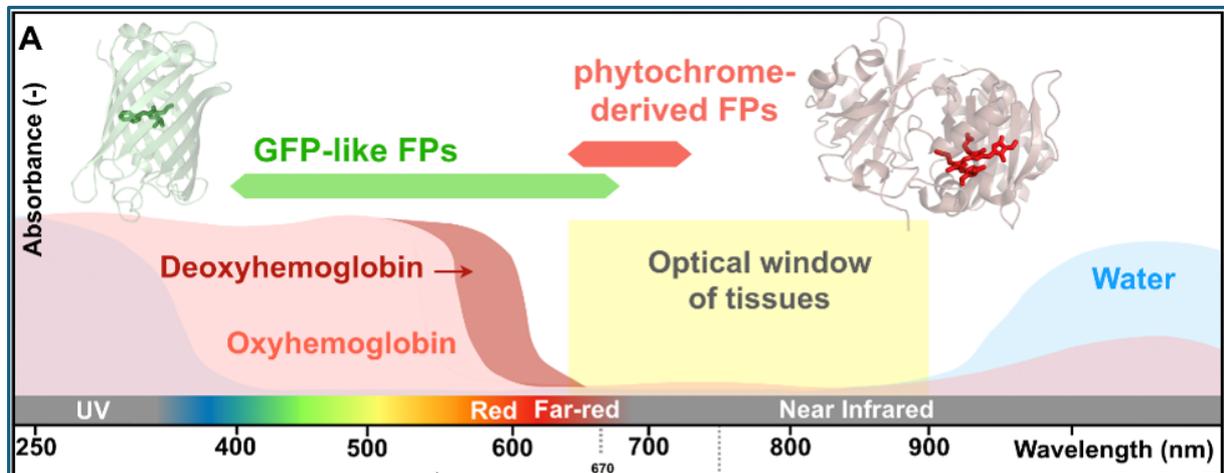


Figure 27 : Spectre de la lumière de l'UV au proche infra-rouge mettant en évidence les plages spectrales utiles des FP de type GFP et celles dérivées des phytochromes, ainsi que la fenêtre optique des tissus convenant à l'imagerie tissulaire.

Notre objectif est donc maintenant de parvenir à développer des protéines fluorescentes permettant de tirer avantage plus largement de cette fenêtre optique, car les protéines existantes sont limitées à des maxima d'émission en-dessous de 725 nm. La relative confidentialité du projet m'amène à ne pas pouvoir détailler plus nos actuelles avancées dans ce manuscrit mais je ne manquerai pas de le faire à l'oral. **Ce projet bénéficie d'un soutien du Labex Gral (EUR CBS UGA) avec un financement de thèse ainsi que d'un soutien de l'ANR (ANR-22-CE11-0021 - InfraredFP800). Je suis co-encadrant du doctorant qui nous a rejoint en octobre 2023 sur ce sujet de thèse, Mohammad Chorfa.**

Conclusion provisoire

J'ai complètement tourné la page de NOX courant 2021. En l'espace de trois ans, avec Antoine, j'ai déjà eu l'opportunité de participer à des travaux qui ont été valorisés dans deux articles^{105,114} et j'ai l'opportunité de co-encadrer un doctorant qui va terminer prochainement sa 2^e année de thèse. Les résultats que nous avons obtenus sont très encourageants et une publication est en cours de rédaction. Les protéines fluorescentes me permettent de jouer de toutes les cordes techniques dont je dispose, de la biologie moléculaire à la biologie structurale aussi j'ai à cœur

de persévérer dans cette thématique et de m'améliorer dans mon niveau de compréhension de ces petites lampes de poche moléculaires.

Notes supplémentaires

Je ne détaillerai pas ici mes activités universitaires car, comme son nom l'indique, l'Habilitation à Diriger des Recherches ne s'intéresse finalement pas à ce qui est à côté de la Science. Cela étant dit, je prendrai le temps de détailler un peu plus ce pan entier de ma vie le jour de l'oral. Enseignant-chercheur c'est un choix mais parfois c'est aussi un cas de conscience car pour évoluer dans la carrière il faut continuer à être productif en science mais il faut aussi s'investir au sein de son université. Je pense y arriver mais au prix de beaucoup d'énergie.

Merci d'avoir pris le temps de me lire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cairo, G. & Pietrangelo, A. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem. J.* **352 Pt 2**, 241–250 (2000).
2. Eisenstein, R. S. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 627–662 (2000).
3. Pantopoulos, K. & Hentze, M. W. Nitric Oxide, Oxygen Radicals, and Iron Metabolism. in *Nitric Oxide* 293–313 (Elsevier, 2000). doi:10.1016/B978-012370420-7/50020-4.
4. Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H. & Stout, C. D. Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* **31**, 2735–2748 (1992).
5. Robbins, A. H. & Stout, C. D. The structure of aconitase. *Proteins* **5**, 289–312 (1989).
6. Rouault, T. A. Post-transcriptional regulation of human iron metabolism by iron regulatory proteins. *Blood Cells. Mol. Dis.* **29**, 309–314 (2002).
7. Lloyd, S. J., Lauble, H., Prasad, G. S. & Stout, C. D. The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a:citrate complex. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **8**, 2655–2662 (1999).
8. Haile, D. J. *et al.* Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11735–11739 (1992).
9. Haile, D. J. *et al.* Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7536–7540 (1992).
10. Brazzolotto, X., Gaillard, J., Pantopoulos, K., Hentze, M. W. & Moulis, J. M. Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 21625–21630 (1999).
11. Emery-Goodman, A., Hirling, H., Scarpellino, L., Henderson, B. & Kühn, L. C. Iron regulatory factor expressed from recombinant baculovirus: conversion between the RNA-binding apoprotein and Fe-S cluster containing aconitase. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1457–1461 (1993).
12. Kennedy, M. C., Mende-Mueller, L., Blondin, G. A. & Beinert, H. Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11730–11734 (1992).
13. Kim, S. Y., Tak, J. K. & Park, J.-W. Inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by singlet oxygen derived from photoactivated rose bengal. *Biochimie* **86**, 501–507 (2004).
14. Narahari, J., Ma, R., Wang, M. & Walden, W. E. The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 16227–16234 (2000).
15. Pantopoulos, K., Weiss, G. & Hentze, M. W. Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3781–3788 (1996).
16. Ke, Y., Wu, J., Leibold, E. A., Walden, W. E. & Theil, E. C. Loops and bulge/loops in iron-responsive element isoforms influence iron regulatory protein binding. Fine-tuning of mRNA regulation? *J. Biol. Chem.* **273**, 23637–23640 (1998).
17. Theil, E. C. Targeting mRNA to regulate iron and oxygen metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 87–93 (2000).
18. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. & Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285–297 (2004).
19. Muckenthaler, M., Gray, N. K. & Hentze, M. W. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol. Cell* **2**,

383–388 (1998).

20. Hentze, M. W. & Kühn, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8175–8182 (1996).

21. Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H. & Stout, C. D. Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound. *J. Mol. Biol.* **237**, 437–451 (1994).

22. Dupuy, J. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction data for the aconitase form of human iron-regulatory protein 1. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 482–485 (2005).

23. Dupuy, J. *et al.* Crystal Structure of Human Iron Regulatory Protein 1 as Cytosolic Aconitase. *Structure* **14**, 129–139 (2006).

24. Walden, W. E. *et al.* Structure of Dual Function Iron Regulatory Protein 1 Complexed with Ferritin IRE-RNA. *Science* **314**, 1903–1908 (2006).

25. Lacy, D. B. & Stevens, R. C. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J. Mol. Biol.* **291**, 1091–1104 (1999).

26. Swaminathan, S. & Eswaramoorthy, S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 693–699 (2000).

27. Dong, M. *et al.* SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* **312**, 592–596 (2006).

28. Chai, Q. *et al.* Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* **444**, 1096–1100 (2006).

29. Jin, R., Rummel, A., Binz, T. & Brunger, A. T. Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* **444**, 1092–1095 (2006).

30. Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H. & Binz, T. Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* **279**, 30865–30870 (2004).

31. Rummel, A. *et al.* Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 359–364 (2007).

32. Yowler, B. C., Kensinger, R. D. & Schengrund, C.-L. Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* **277**, 32815–32819 (2002).

33. Montecucco, C. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.* **11**, 314–317 (1986).

34. Tsukamoto, K. *et al.* Binding of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **280**, 35164–35171 (2005).

35. Yowler, B. C. & Schengrund, C.-L. Glycosphingolipids-sweets for botulinum neurotoxin. *Glycoconj. J.* **21**, 287–293 (2004).

36. Jayaraman, S., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D. & Swaminathan, S. Common binding site for disialyllactose and tri-peptide in C-fragment of tetanus neurotoxin. *Proteins* **61**, 288–295 (2005).

37. Dolimbek, B. Z., Aoki, K. R., Steward, L. E., Jankovic, J. & Atassi, M. Z. Mapping of the regions on the heavy chain of botulinum neurotoxin A (BoNT/A) recognized by antibodies of cervical dystonia patients with immunoresistance to BoNT/A. *Mol. Immunol.* **44**, 1029–1041 (2007).

38. Dolimbek, B. Z., Steward, L. E., Aoki, K. R. & Atassi, M. Z. Immune recognition of botulinum neurotoxin B: antibody-binding regions on the heavy chain of the toxin. *Mol. Immunol.* **45**, 910–924 (2008).

39. Stenmark, P., Dupuy, J., Imamura, A., Kiso, M. & Stevens, R. C. Crystal Structure of Botulinum Neurotoxin Type A in Complex with the Cell Surface Co-Receptor GT1b—Insight

- into the Toxin–Neuron Interaction. *PLoS Pathog.* **4**, e1000129 (2008).
40. Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E. R. & Stevens, R. C. Crystal Structure of the Botulinum Neurotoxin Type G Binding Domain: Insight into Cell Surface Binding. *J. Mol. Biol.* **397**, 1287–1297 (2010).
41. Jacobson, M. J. *et al.* Purification, Modeling, and Analysis of Botulinum Neurotoxin Subtype A5 (BoNT/A5) from *Clostridium botulinum* Strain A661222. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4217–4222 (2011).
42. Jacky, B. P. S. *et al.* Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) as a Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin Serotype A (BoNT/A). *PLoS Pathog.* **9**, e1003369 (2013).
43. Johnson, E. A. *et al.* A novel subtype of *Clostridium botulinum* neurotoxin type a and uses thereof. (2010).
44. Nathan, C. & Cunningham-Bussel, A. Beyond oxidative stress: an immunologist’s guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 349–361 (2013).
45. Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189 (2004).
46. Babior, B. M., Curnutte, J. T. & Kipnes, B. S. Pyridine nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes. *J. Clin. Invest.* **56**, 1035–1042 (1975).
47. Clark, R. A. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* **179 Suppl 2**, S309–317 (1999).
48. Groom, Q. J. *et al.* rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **10**, 515–522 (1996).
49. Bánfi, B. *et al.* A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* **276**, 37594–37601 (2001).
50. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G. & Lambeth, J. D. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**, 131–140 (2001).
51. Edens, W. A. *et al.* Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J. Cell Biol.* **154**, 879–891 (2001).
52. Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P. & Leto, T. L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8010–8014 (2000).
53. Lambeth, J. D., Cheng, G., Arnold, R. S. & Edens, W. A. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 459–461 (2000).
54. Suh, Y. A. *et al.* Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79–82 (1999).
55. Rotrosen, D., Yeung, C. L., Leto, T. L., Malech, H. L. & Kwong, C. H. Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **256**, 1459–1462 (1992).
56. von Rozycki, T., Yen, M.-R., Lende, E. E. & Saier, M. H. The YedZ family: possible heme binding proteins that can be fused to transporters and electron carriers. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 129–140 (2004).
57. Zhang, X., Krause, K.-H., Xenarios, I., Soldati, T. & Boeckmann, B. Evolution of the ferric reductase domain (FRD) superfamily: modularity, functional diversification, and signature motifs. *PLoS One* **8**, e58126 (2013).
58. Juillan-Binard, C. *et al.* A Two-component NADPH Oxidase (NOX)-like System in Bacteria Is Involved in the Electron Transfer Chain to the Methionine Sulfoxide Reductase MsrP. *J. Biol. Chem.* **292**, 2485–2494 (2017).
59. Prosser, B. L., Ward, C. W. & Lederer, W. J. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* **333**, 1440–1445 (2011).

60. O'Neill, S., Brault, J., Stasia, M.-J. & Knaus, U. G. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol.* **6**, 135–156 (2015).
61. De Deken, X. *et al.* Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* **275**, 23227–23233 (2000).
62. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
63. Bettaieb, A. *et al.* Hepatocyte Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Oxidase 4 Regulates Stress Signaling, Fibrosis, and Insulin Sensitivity During Development of Steatohepatitis in Mice. *Gastroenterology* **149**, 468–480.e10 (2015).
64. Lan, T., Kisseleva, T. & Brenner, D. A. Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation. *PLoS One* **10**, e0129743 (2015).
65. Wang, P. *et al.* Promising Therapy Candidates for Liver Fibrosis. *Front. Physiol.* **7**, 47 (2016).
66. Liang, S., Kisseleva, T. & Brenner, D. A. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. *Front. Physiol.* **7**, 17 (2016).
67. Younossi, Z. M. *et al.* The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* **64**, 1577–1586 (2016).
68. Altenhöfer, S. *et al.* The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **69**, 2327–2343 (2012).
69. Altenhöfer, S., Radermacher, K. A., Kleikers, P. W. M., Wingler, K. & Schmidt, H. H. H. W. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 406–427 (2015).
70. Cifuentes-Pagano, M. E., Meijles, D. N. & Pagano, P. J. Nox Inhibitors & Therapies: Rational Design of Peptidic and Small Molecule Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 6023–6035 (2015).
71. Bedard, K., Lardy, B. & Krause, K.-H. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* **89**, 1107–1112 (2007).
72. Rinnerthaler, M. *et al.* Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8658–8663 (2012).
73. Georgatsou, E. & Alexandraki, D. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3065–3073 (1994).
74. Roman, D. G., Dancis, A., Anderson, G. J. & Klausner, R. D. The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4342–4350 (1993).
75. Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**, 3249–3277 (2008).
76. Lord, C. I. *et al.* Single-step immunoaffinity purification and functional reconstitution of human phagocyte flavocytochrome b. *J. Immunol. Methods* **329**, 201–207 (2008).
77. Taylor, R. M. & Jesaitis, A. J. Immunoaffinity purification of human phagocyte flavocytochrome b and analysis of conformational dynamics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **412**, 429–437 (2007).
78. de Mendez, I. & Leto, T. L. Functional reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase by transfection of its multiple components in a heterologous system. *Blood* **85**, 1104–1110 (1995).
79. Price, M. O. *et al.* Creation of a genetic system for analysis of the phagocyte respiratory burst: high-level reconstitution of the NADPH oxidase in a nonhematopoietic system. *Blood* **99**, 2653–2661 (2002).

80. Zhen, L. *et al.* Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9832–9836 (1993).
81. Ostuni, M. A., Lamanuzzi, L. B., Bizouarn, T., Dagher, M.-C. & Baciou, L. Expression of functional mammal flavocytochrome b(558) in yeast: comparison with improved insect cell system. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1179–1188 (2010).
82. Ezzine, A., Souabni, H., Bizouarn, T. & Baciou, L. Recombinant form of mammalian gp91(phox) is active in the absence of p22(phox). *Biochem. J.* **462**, 337–345 (2014).
83. Rotrosen, D., Yeung, C. L. & Katkin, J. P. Production of recombinant cytochrome b558 allows reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase solely from recombinant proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 14256–14260 (1993).
84. Taylor, R. M. *et al.* Analysis of human phagocyte flavocytochrome b(558) by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **281**, 37045–37056 (2006).
85. Dahan, I. *et al.* Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by ‘peptide walking’. *J. Biol. Chem.* **277**, 8421–8432 (2002).
86. Nisimoto, Y., Ogawa, H., Miyano, K. & Tamura, M. Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex. *Biochemistry* **43**, 9567–9575 (2004).
87. Marques, B. *et al.* Liposome-mediated cellular delivery of active gp91(phox). *PLoS One* **2**, e856 (2007).
88. Wallach, T. M. & Segal, A. W. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem. J.* **321 (Pt 3)**, 583–585 (1997).
89. Oda, T. *et al.* Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J. Biol. Chem.* **285**, 1435–1445 (2010).
90. Hajjar, C. *et al.* The NOX Family of Proteins Is Also Present in Bacteria. *mBio* **8**, e01487-17 (2017).
91. Pember, S. O., Heyl, B. L., Kinkade, J. M. & Lambeth, J. D. Cytochrome b558 from (bovine) granulocytes. Partial purification from Triton X-114 extracts and properties of the isolated cytochrome. *J. Biol. Chem.* **259**, 10590–10595 (1984).
92. Clark, R. A., Leidal, K. G., Pearson, D. W. & Nauseef, W. M. NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4065–4074 (1987).
93. Nozaki, M., Takeshige, K., Sumimoto, H. & Minakami, S. Reconstitution of the partially purified membrane component of the superoxide-generating NADPH oxidase of pig neutrophils with phospholipid. *Eur. J. Biochem.* **187**, 335–340 (1990).
94. Hashida, S. *et al.* Binding of FAD to cytochrome b558 is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.* **279**, 26378–26386 (2004).
95. Nisimoto, Y., Diebold, B. A., Cosentino-Gomes, D. & Lambeth, J. D. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry* **53**, 5111–5120 (2014).
96. Breyton, C. *et al.* Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1861**, 939–957 (2019).
97. Petit-Hartlein, I. *et al.* X-ray structure and enzymatic study of a bacterial NADPH oxidase highlight the activation mechanism of eukaryotic NOX. *eLife* **13**, RP93759 (2024).
98. Dupuy, J., HAJJAR, C., CHERRIER, M. & Fieschi, F. Proteines nadph oxydases. (2015).
99. Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp.*

Physiol. **59**, 223–239 (1962).

100. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233 (1992).

101. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805 (1994).

102. Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544 (1998).

103. Piatkevich, K. D., Subach, F. V. & Verkhusha, V. V. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3441–3452 (2013).

104. Piatkevich, K. D., Subach, F. V. & Verkhusha, V. V. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3441 (2013).

105. Zarowny, L. *et al.* Cyan fluorescent proteins derived from mNeonGreen. *Protein Eng. Des. Sel.* **35**, gzac004 (2022).

106. Shaner, N. C. *et al.* A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat. Methods* **10**, 407–409 (2013).

107. Pletnev, V. Z. *et al.* Structure of the red fluorescent protein from a lancelet (*Branchiostoma lanceolatum*): a novel GYG chromophore covalently bound to a nearby tyrosine. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1850–1860 (2013).

108. Bomati, E. K., Haley, J. E., Noel, J. P. & Deheyn, D. D. Spectral and structural comparison between bright and dim green fluorescent proteins in *Amphioxus*. *Sci. Rep.* **4**, 5469 (2014).

109. Yue, J.-X., Holland, N. D., Holland, L. Z. & Deheyn, D. D. The evolution of genes encoding for green fluorescent proteins: insights from cephalochordates (*amphioxus*). *Sci. Rep.* **6**, 28350 (2016).

110. Roldán-Salgado, A., Sánchez-Barreto, C. & Gaytán, P. LanFP10-A, first functional fluorescent protein whose chromophore contains the elusive mutation G67A. *Gene* **592**, 281–290 (2016).

111. Clavel, D. *et al.* Structural analysis of the bright monomeric yellow-green fluorescent protein mNeonGreen obtained by directed evolution. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **72**, 1298–1307 (2016).

112. Gotthard, G., von Stetten, D., Clavel, D., Noirclerc-Savoye, M. & Royant, A. Chromophore Isomer Stabilization Is Critical to the Efficient Fluorescence of Cyan Fluorescent Proteins. *Biochemistry* **56**, 6418–6422 (2017).

113. Bindels, D. S. *et al.* mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat. Methods* **14**, 53–56 (2017).

114. Gadella, T. W. J. *et al.* mScarlet3: a brilliant and fast-maturing red fluorescent protein. *Nat. Methods* **20**, 541–545 (2023).