

Université Denis Diderot
Paris VII

**DIPLÔME D'ÉTUDES APPROFONDIES
ANALYSE DE GÉNOMES ET MODÉLISATION
MOLECULAIRE**

Étude des propriétés dynamiques des Cytochromes P450_{bm3} et
P450_{c21}

présenté par

Alexandre GILLET

Stage effectué sous la direction de M. J-F. GIBRAT,
Unité Mathématique, Informatique et Génome de l'INRA de Versailles.

7 juillet 2000

Remerciements

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à JF. Gibrat pour m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir guidé durant ce stage.

Je remercie également Antoine Marin pour son aide ainsi que Karel Zimmermann et Jean Garnier pour leur discussion qui m'ont grandement apporté tant au niveau de la modélisation moléculaire que de la culture générale.

Enfin je remercie tous les membres de l'unité MIG (Mathématiques, Informatique et Génome) dirigée par F. Rodolphe, pour leur gentillesse et leur accueil.

Et pour finir, je remercie mon sponsor Coca Cola pour son soutien.

Résumé

Dans le but de mieux comprendre les mutations trouvées dans le gène CYP21 qui affectent le cytochrome P450C21, nous avons dans un premier temps étudié les mécanismes moléculaires de cette protéine par dynamique moléculaire. Le P450BM3, protéine bactérienne dont la structure et la dynamique sont connues, a servi de référence pour construire et étudier le modèle de P450C21. L'étude a mis en évidence que le canal du C21 se ferme par les mouvements des domaines F/G, N-terminal et β 1.1-1.2, tout comme chez le BM3. Une seconde étape a permis de montrer que la progestérone est liée aux résidus Arg91, Glu294 et Thr295. Ces liaisons empêchent tout autre site que la position 21 de la progestérone d'être hydroxylé.

Abstract

In order to better understand the mutations found in the CYP21 gene that affect the cytochrome P450C21, we studied the molecular mechanism of that protein by molecular dynamics. We used the bacterial cytochrome P450BM3 whose 3D structure is known as a template to build and study the model of P450C21. Our analysis shows that the substrate access channel of P450C21 undergoes the same motion as those of BM3. The F/G domain, the N-terminal region and the β 1.1-1.2 domain move in concerted way to close down the channel. We also found that progesterone is bound at one end by residue Arg91 and at the other end by residues Glu294 and Thr295. The substrate is thus tied up and only one position (C21) can be hydroxylized.

Table des matières

1	Introduction	5
2	Matériels et Méthodes	6
2.1	Les structures	6
2.1.1	P450bm3	6
2.1.2	P450C21	7
2.2	Construction, minimisation et simulation de dynamique moléculaire des 4 systèmes étudiés.	7
2.3	Paramètres utilisés pour étudier les changements conformationnels de l'entrée du canal d'accès du substrat.	9
3	Résultats et Discussion	10
3.1	Les deux systèmes de P450bm3 (bm3 et bm3lig)	10
3.1.1	Mouvement du canal.	10
3.1.2	L'hélice I.	11
3.1.3	Le ligand.	12
3.2	Les systèmes de C21 (c21 et c21lig).	15
3.2.1	Étude de l'entrée du canal.	15
3.2.2	L'hélice I.	16
3.2.3	Analyse du ligand.	17
4	Conclusion	18
5	Annexes	20
5.1	Organisation des éléments de structure secondaire des cytochromes P450.	20
5.2	Les résidus formant le canal d'accès chez C21 et BM3.	21
5.3	Alignement Bm3/C21.	22
5.4	Structure chimique des ligands.	23
5.5	Rms résidus par résidus de c21 et c21lig	23

Table des figures

1	Structures de P450bm3 et P450c21	8
2	Les variations des distances sur les simulations de BM3	11
3	Les variations des angles sur les simulations de BM3	12
4	Histogrammes des distances Ligand-Hème	13
5	Schéma des mouvements	14
6	Les variations des distances sur les simulations de C21	16
7	Comparaison de la trace de C α chez C21lig	17
8	Les variations des distances C21-Fe et C17-Fe	18

Liste des tableaux

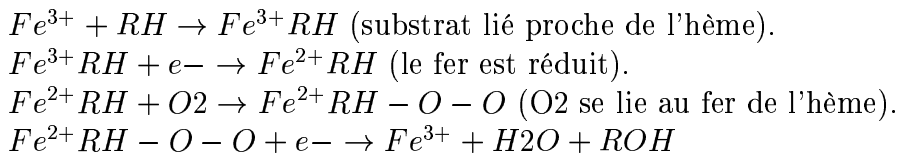
1	Systèmes étudiés	6
2	Distances étudiées	9
3	Définitions des domaines	9
4	Statistiques sur les distances d1, d2 et d3	10
5	Rmsd	12
6	Statistiques sur les distances d1, d2 et d3 des systèmes C21	15

Abreviations :

PDB Protein Data Bank
BM3 cytochrome P450BM3
C21 cytochrome P450C21
3D tridimensionnelle

1 Introduction

Les cytochromes P450 forment une superfamille d'enzyme hème-thiolate, présents chez toutes les espèces, dont environ 500 membres ont été séquencés [1]. Les cytochromes P450 (CYP) sont des mono-oxygénases dont la principale réaction catalytique est l'activation et le clivage d'une molécule d'oxygène. Ils permettent l'hydroxylation d'un substrat hydrophobe, augmentant son caractère polaire, selon le schéma général suivant :



Les électrons nécessaires à la réaction sont fournis par un partenaire redox. Les cytochromes P450 peuvent être séparés en deux classes selon leur partenaire redox :

- la classe I est présente dans la membrane des mitochondries des eucaryotes et chez la plupart des bactéries. Elle requiert une flavine adenine dinucleotide (FAD) contenant une réductase et une protéine fer-soufre.
- La classe II est liée au réticulum endoplasmique et interagit directement avec une réductase contenant une FAD et une flavine mononucléotide(FMN) [2].

A ce jour, seules cinq structures de P450 ont été résolues : P450cam [3], P450bm3 [2], P450eryf [4], P450terp [5] et P450nor [6]. Toutes appartiennent à des organismes procaryotes sauf P450nor qui se trouve dans un champignon.

Notre étude s'intéresse à une protéine humaine, le P450c21 codé par le gène CYP21 situé dans le complexe majeur d'histocompatibilité HLA du chromosome 6. Le CYP21 code pour une enzyme microsomique spécifique des surrénales qui catalyse l'hydroxylation en position 21 de la progestérone (voir figure en annexe 5.4) et du 17-hydroxyprogestérone. Cette protéine appartient à la classe II des P450. Comme toutes les protéines membranaires, elle est difficile à cristalliser. Le cytochrome P450bm3 est la seule structure connue appartenant à la classe II des cytochromes P450. La structure tridimensionnelle de BM3 a donc été utilisée pour construire des modèles de cytochromes P450 de classe II, comme pour le modèle de C21 [7].

Différentes mutations de cette protéine sont la cause d'une maladie héréditaire : l'aplasie congénitale des surrénales. Cette maladie se caractérise par un désordre dans la différenciation sexuelle et la croissance somatique. Une quantité anormale d'androgènes est sécrétée par les surrénales entraînant une virilisation prénatale ou postnatale [8].

Mornet et Gibrat [7], afin de mieux comprendre le rôle de ces mutations au niveau moléculaire, ont construit un modèle du cytochrome P450c21 basé sur la structure du cytochrome P450bm3 et ont procédé à une analyse statique de ce modèle. Dans le travail présenté ici, nous nous intéressons maintenant aux aspects dynamiques de la protéine. Pour cela nous avons effectué une simulation de dynamique moléculaire de modèles de P450c21. Cette étude se focalise sur les propriétés dynamiques du canal contenant le substrat ainsi que sur les résidus susceptibles de stabiliser et d'orienter correctement le substrat par rapport à l'hème.

Plusieurs études de dynamique moléculaire ont déjà été faites sur P450bm3 [9, 10, 11].

Ces études vont nous servir de référence dans l'étude de notre dynamique moléculaire sur le cytochrome P450c21 et nous permettre de valider le modèle utilisé. BM3 et C21 ont des fonctions et des structures similaires, on s'attend donc à observer des mécanismes moléculaires similaires.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Les structures

L'étude porte sur 4 structures différentes (voir table 1). Nous avons étudié à la fois le cytochrome P450bm3 et le cytochrome P450c21, car nos modèles de C21 ont été construits à partir de la structure du BM3.

2.1.1 P450bm3

Le cytochrome P450BM3 est une protéine bactérienne de classe II des P450. Cette protéine catalyse l'oxydation des acides gras saturés et nonsaturés. On connaît trois conformations différentes de cette protéine. En effet, l'enzyme subit des changements conformationnels lors de la fixation du substrat qui sont caractérisés entre autres par la fermeture du canal d'accès à l'hème. La structure résolue par Li et Poulos 1997 [12], fichier PDB 1FAG, est dans une conformation fermée avec un ligand, l'acide palmitoléique, dans le site actif. Le fichier PDB (2BMH)[2] contient 2 chaînes A et B, dans lesquelles le canal se trouve dans un état ouvert, la chaîne A a un canal d'accès un peu plus fermé que la chaîne B.

La protéine est constituée de 471 résidus, dont seulement 457 sont présents dans la structure 3D. L'enzyme a une forme de prisme triangulaire constitué de 15 hélices α et 4 feuillets β . On peut distinguer un domaine α et un domaine β . L'hème est situé entre l'hélice I et L, à l'interface entre les 2 domaines (voir schéma 5.1 en annexe). Le site de fixation du substrat est formé par les hélice B' et F et les feuillets β 1 et 4. Il inclut les résidus suivants : Phe42, Arg47, Tyr51, Phe87, Leu181, Met185, Leu188, Ala191, Ala328, Ala330, Met354 et Leu437 [9] (l'ensemble des résidus appartenant au canal est présenté dans la table 5.2 de l'annexe).

La figure 1 représente les deux états étudiés de la protéine BM3. Nous avons étudié la structure BMH chaîne A, système nommé bm3 par la suite, et la structure FAG chaîne A, système nommé bm3lig dans la suite du rapport.

système	état du canal	ligand	structure PDB
bm3	ouvert	non	2BMH chaîne A [2]
bm3lig	fermé	acide palmitoléique	1FAG chaîne A [12]
c21	ouvert	non	modèle basé sur bm3
c21lig	fermé	progestérone	modèle basé sur bm3lig

TAB. 1 – Descriptions des systèmes étudiés.

2.1.2 P450C21

A ce jour aucune structure du C21 n'a pu être résolue, nous avons donc travaillé sur deux modèles (voir table 1). Ceux ci ont été construits à partir de structures 3D de BM3 [7]. Le premier modèle c21 est construit à partir d'une conformation ouverte de BM3, la structure modèle utilisée est la chaîne A de 2BMH [2]. Le second modèle c21lig a été construit à partir d'une conformation fermée de BM3, fichier 1FAG [12]. Le modèle c21 est constitué des résidus 26 à 482, et le modèle c21lig est constitué des résidus 26-494. La région 1-25 correspond à la partie de la protéine lui permettant d'être fixée à la membrane. L'annexe 5.3 présente l'alignement utilisé pour construire les modèles.

Les modèles et le BM3 sont sensiblement identiques au niveau des structures secondaires, comme on peut le voir sur la figure 1 et l'alignement proposé en annexe. Les deux protéines divergent au niveau des boucles. Les insertions ou délétions se retrouvent uniquement dans ces régions.

Au niveau du canal, il y a peu de résidus conservés, mais le canal garde les mêmes caractéristiques : long canal hydrophobe non aromatique. La non conservation des résidus s'explique par le fait que la région du canal est spécifique au ligand de la protéine (voir le tableau 5.2 en annexes). La figure 1 montre les deux modèles de P450c21 étudiés.

2.2 Construction, minimisation et simulation de dynamique moléculaire des 4 systèmes étudiés.

Les systèmes bm3, bm3lig, c21 et c21lig, pour lesquels une trajectoire a été calculée, ont subi les étapes de préparations suivantes :

- ajout des atomes d'hydrogènes en utilisant le programme Amber [14].
- 2000 pas de minimisation d'énergie avec les atomes lourds fixes afin de relaxer uniquement les hydrogènes.
- hydratation du système par une couche d'eau de 7 Å. Nous n'avons pas utilisé de boîte d'eau car le nombre d'atomes qu'implique une telle procédure ne permettait pas d'obtenir les résultats de calcul dans un temps raisonnable. De plus les différentes simulations du BM3 ont aussi été faites avec un système hydraté [9, 10, 11].
- Neutralisation du système par des contre-ions.
- 2000 pas de minimisations des molécules de solvant et des ions.
- 2000 pas de minimisation avec tous les atomes libres de se mouvoir.

Les minimisations d'énergie combinent les méthodes de la plus grande pente et du gradient conjugué. Nous avons utilisé le champ de force parm94 de Cornell et al [15] proposé dans amber 5.0 [14] pour les acides aminés. L'hème a été simulé dans son état de repos ("ferric resting state"). Les paramètres du champs de force pour l'hème et pour l'acide palmitoléique sont ceux utilisés par Harris et Loew [11]. Les paramètres pour la progestérone nous ont été aimablement fournis par Craig Marhefka (dans parm99 from Jumnei et al, to be published).

Les vitesses des atomes ont été initialisées en utilisant une distribution de Maxwell à 70K. Puis les systèmes ont été graduellement chauffés sur une période de 10 ps jusqu'à 300K. Les simulations ont ensuite poursuivi sans contrainte durant 450 ps à 300K. Le pas d'intégration utilisé est de 1.0 fs. Les coordonnées ont été enregistrées tous les 0.1 ps, ce qui donne 4500 conformations. Afin de minimiser le nombre des interactions entre atomes non liés, on a utilisé un "nonbonded cutoff" de 12 Å. Le solvant étant explicite, nous avons

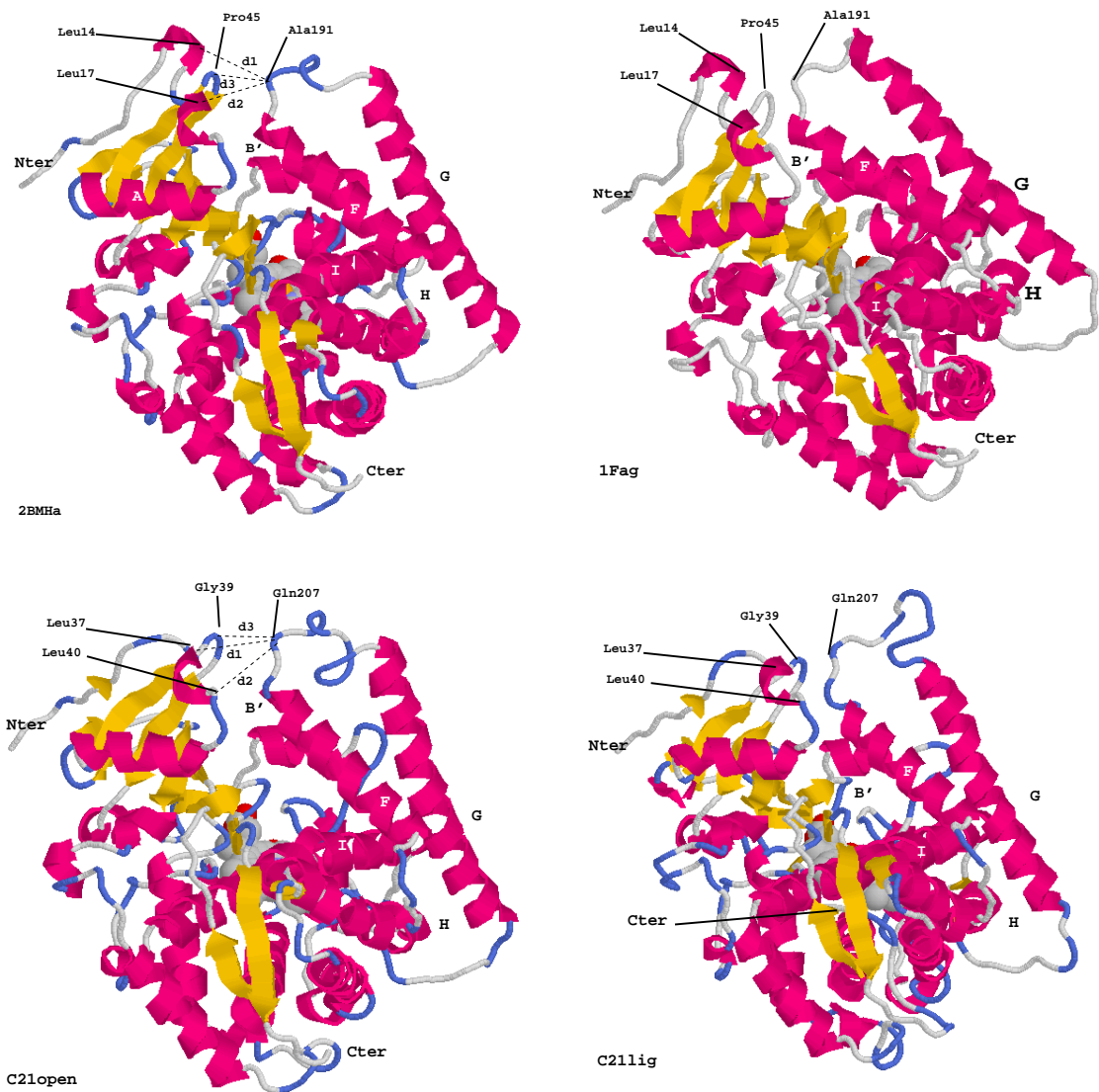


FIG. 1 – Structures des P450_{bm3} et P450_{c21} : 2BMHa conformation ouverte de BM3, 1FAG conformation fermée, C21open modèle basé sur 2BMHa et C21lig modèle basé sur 1FAG. Les molécules sont vues par la face d'accès du substrat. Les hélices α sont représentées en violet, les feuilletts β comme des flèches jaunes, les boucles en blanc et les tournants en bleu. L'hème est représenté en modèle à boule et CPK. Les structures secondaires étudiées (hélices F, G, H et B'), ainsi que le N et C terminal sont indiqués.(figure préparée avec Rasmol[13] et showcase)

utilisé une constante diélectrique égale à 1.

Les minimisations d'énergie et les simulations de dynamique moléculaire ont été faites avec la suite de programmes AMBER 5 sur une grappe de PC linux Pentium III 500Mhz.

2.3 Paramètres utilisés pour étudier les changements conformationnels de l'entrée du canal d'accès du substrat.

Un des buts de cette étude est de déterminer les mouvements (ouverture/fermeture) du canal chez P450c21 en se basant sur l'étude du P450bm3. Trois distances ont été contrôlées (voir figure 1) au cours de la dynamique pour chaque système. Ces distances mesurent le degré d'ouverture ou de fermeture de l'entrée du canal. L'analyse a été faite sur les 4500 conformations conservés durant les 450 ps de simulation et en utilisant le module carnal de AMBER [14].

La table 2 présente les distances mesurées sur les systèmes de BM3 et de C21. Les résidus

	BM3	C21	mouvement entre :
d1	C α Leu14-C α Ala191	C α Leu37-C α Gln207	N-terminal et boucle F/G
d2	C α Leu17-C α Ala191	C α Leu40-C α Gln207	N-terminal et boucle F/G
d3	C α Pro45-C α Ala191	C α Gly64-C α Gln207	Rabat et boucle F/G

TAB. 2 – Distances étudiées pour les systèmes BM3 et C21.

Leu14, Leu 17 et Leu37, Leu 40 sont situés dans la région N-terminale respectivement des cytochromes P450bm3 et P450c21. Ala191 et Gln207 se trouvent sur la boucle F/G dans leurs structures respectives, BM3 et C21. Les distances d1 et d3, étudiées pour BM3, sont les même que celles utilisées par Chang et Loew [11]. La figure 1 montre les trois distances sur la structure de bm3 et de c21. Les protéines sont séparées en deux parties, une fixe et une mobile. La partie mobile est constitué de 3 domaines : domaine F/G, région N-terminale et le rabat (voir tableau 3) qui ont été déterminés, dans le cas de BM3 par Arnold et Ornstein [10] et par l'utilisation des programmes DomainFinder [16, 17] et DynDom [18]. Nous avons uniquement utilisé ces logiciels pour déterminer les différents domaines au sein du cytochrome P450C21. Le mouvement du domaine F/G [11, 10], est

Domaine	BM3	C21
Fixe	71-141,252-456	112-176,278-480
F/G	142-251	177-277
N-terminal	1-37	26-56
Rabat	37-53	57-71

TAB. 3 – Définitions des domaines pour les systèmes BM3 et C21. Les résidus non définis appartiennent à des domaines intermédiaires.

étudié par la mesure de deux angles au cours des simulations. Les angles FHB' et GHB' sont définis par trois points qui sont les centres de masses des hélices F,H B' et G, H, B' respectivement (voir figure 5). Les hélices H et B' font partie des structures secondaires qui bougent très peu durant la dynamique.

3 Résultats et Discussion

3.1 Les deux systèmes de P450bm3 (bm3 et bm3lig)

3.1.1 Mouvement du canal.

Les structures cristallographiques, bm3 et bm3lig, diffèrent au niveau de l'état d'ouverture du canal d'accès du substrat (voir figure 1). Comme il est indiqué dans la table 4, les distances d1, d2 et d3, qui valent respectivement 9.72, 9.39 et 10.99 Å dans bm3 et 7.06, 7.57, 7.33 Å dans bm3lig, montrent clairement que bm3lig a un canal plus fermé.

temps	d1 bm3	d2 bm3	d3 bm3	d1 bm3lig	d2 bm3lig	d3 bm3lig
struct cristallog	9.72	9.39	10.99	7.06	7.57	7.33
après minimisation	9.20	8.11	9.66	6.93	7.51	7.19
max	13.39	10.66	9.71	14.96	9.89	11.37
min	7.74	6.64	3.95	6.02	4.66	4.39
avg	9.98	8.40	4.81	10.73	6.79	7.5
écart type	0.69	0.65	0.37	1.6	1.0	1.67

TAB. 4 – Statistiques sur les distances d1(C α 14-C α 191), d2(C α 17-C α 191), d3(C α 45-C α 191) pour les systèmes bm3 et bm3lig sur une simulation de dynamique moléculaire de 450 ps .

La structure des deux protéines, dans les deux systèmes, subit uniquement des mouvements négligeables après la minimisation d'énergie. Ceci est en accord avec les simulations faites précédemment par Chang et Loew [11], et Ornstein et Paulsen [9]. La figure 2 montre la variation des 3 distances, pour les 2 systèmes, au cours des 450 ps de simulation. Dans le cas de bm3, les distances d1 et d2, après une faible augmentation lors de la simulation sous contrainte, ont une faible amplitude de variation. Leur valeur moyenne est de 9.98 Å et 8.4 Å respectivement avec un écart type de 0.6. A l'opposé, la distance d3 chute brutalement pendant les 10 premiers picoseconds de simulation, elle passe de 10.9 Å à 4.8 Å. Elle va ensuite subir peu de variation sur le reste de la simulation. Cette diminution de d3 montre que le canal s'est fermé. Cette observation diffère par rapport aux résultats obtenues par Chang et Loew [11]. L'analyse de leur simulation conclut que le système bm3 se ferme un peu, la distance d3 passant de 10.9 Å à 8.9 Å durant la dynamique. Les simulations de 500 ps ne permettent pas de passer dans toutes les conformations possible de la molécule, ce qui explique les différences entre leur simulation et la notre. La variation des angles FHB' et GHB' est représentée sur la figure 3. Lors de la simulation de bm3, ces deux angles vont diminuer. Ceci permet de supposer que la fermeture du canal est due au mouvement du domaine F/G.

L'étude de plusieurs conformations, prises au cours de la simulation, confirme ces données. La fermeture est due au mouvement des domaines F/G et de la région N-terminale. Les parties C-terminale de l'hélice F et N-terminale de l'hélice G se courbe sur l'entrée du canal, ce qui explique la variation des angles et la diminution de la distance d3. La faible diminution de d1 et d2 est due au mouvement de la région N-terminale de la protéine qui s'écarte de l'entrée du canal, certainement pour permettre au domaine F/G de se rabattre (voir une représentation schématique des mouvements sur la figure 5).

Dans le cas de bm3lig, il y a plus de variation pour les 3 distances. La structure initiale est une conformation fermée. Après la minimisation et les 10 ps de simulation

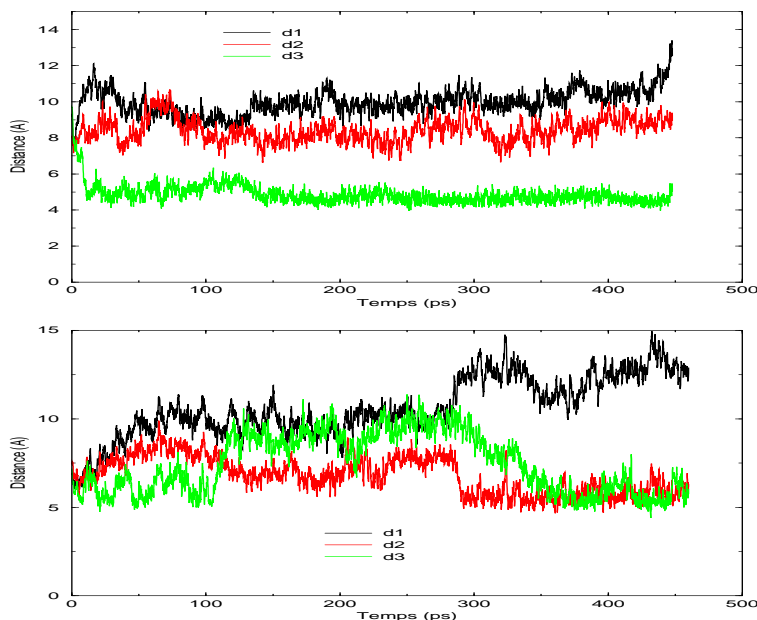


FIG. 2 – Les variations des distances sur les simulations de BM3 : bm3 en haut, bm3lig en bas.

sous contrainte, il y a peu de changement (voir table 4). Dans cette conformation, le domaine F/G est déjà courbé pour fermer le canal. Celui ci ne va pas subir de variation importante. La diminution de l'angle GHB', observée sur la figure 3, correspond à un mouvement vertical de l'hélice B' qui se rapproche de hélice G.

La variation des distances s'explique alors par le mouvement de la région N-terminale et de la région formée par les feuilletts $\beta 1.1$ et 1.2. Cette région, qui porte le résidu Pro45, sera nommée le rabat. Ce domaine subit des mouvements de courbure qui conduisent à la fermeture du canal. Dans la première partie de la simulation, le rabat retourne à une position proche de l'état ouvert ($d3$ est proche de 10 \AA). À la fin de la simulation, il prend une position courbée, canal fermé, ce qui explique la diminution de $d3$ (voir figure 5). En même temps la partie N-terminale se décale de l'entrée du canal pour permettre au rabat de se courber ($d1$ augmente). $d2$ diminue, elle ne suit pas le mouvement de Leu14. Cette partie de la région N-terminale reste proche de son état initial. La région, définie par les résidus 1-14 va pivoter par rapport à la région définie par les résidus 15-20 (voir figure 5).

Les simulations sur BM3 ouvert et BM3 fermé amènent les deux systèmes dans un état fermé. Afin de déterminer si les deux conformations obtenues sont identiques, nous avons superposé la structure moyenne de la simulation bm3 et la structure à 400 ps de bm3lig (structure la plus fermée de la simulation). Nous avons ensuite calculé le rmsd pour les différents domaines. Comme le montre la table 5, les valeurs des rmsd sont supérieures à 4.4 \AA . Les deux structures n'ont donc pas convergées vers une même conformation sur ce court laps de temps de simulation.

3.1.2 L'hélice I.

Ravichandran et collaborateurs [2] ont montré que l'hélice I se déformait dans la région de Ile263 à Thr269 pour former un coude au dessus de l'hème. Li et Poulos [12] ont suggéré que ce coude permet à une molécule d'oxygène de se rapprocher de l'hème pour

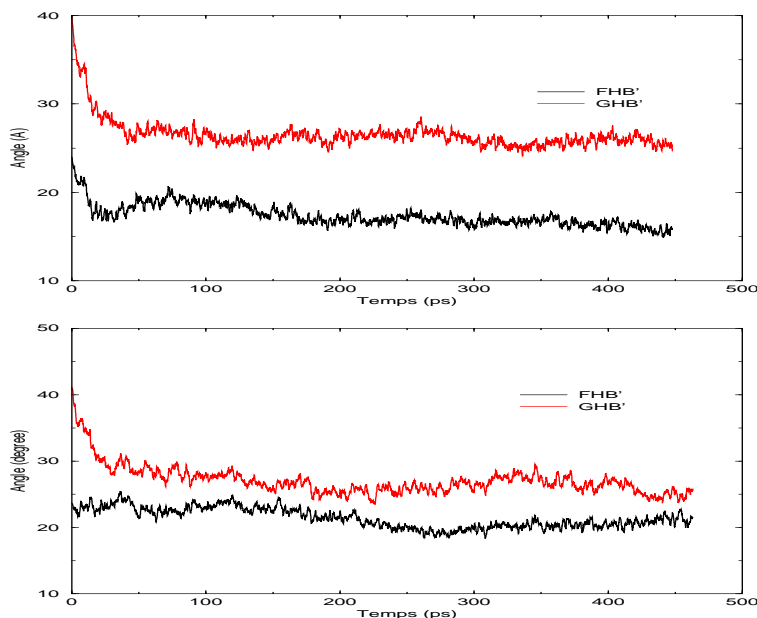


FIG. 3 – Les variations des angles sur les simulations de BM3 : bm3 en haut, bm3lig en bas.

domaine	rmsd (Å)
protéine entière 1-456	4.4
N-terminal (1-70)	6.4
fixe (71-141,252-456)	3.2
F/G (141-252)	5.2

TAB. 5 – Rmsd des $C\alpha$ de différents domaines entre la structure moyenne de la simulation bm3 et la structure à 400ps de la simulation bm3lig. Les structures ont été superposées sur leur domaine fixe.

ensuite se lier à lui. Ces constatations ont été faites à partir de l'étude des structures cristallographiques. Durant la simulation de BM3, ce coude se forme au niveau de l'hélice I. Cette hélice se courbe dans sa partie N-terminale sous l'effet de mouvement du domaine F/G. Ceci est dû au contact existant entre l'hélice I (Ile263) et l'hélice F [12]. Les liaisons hydrogène au sein de l'hélice sont perturbées. Ceci permet à la chaîne latérale de Thr268 de créer une liaison hydrogène avec Ala264, et de maintenir le coude. La dynamique moléculaire met clairement en évidence ce phénomène proposé lors de l'étude des différentes structures cristallographiques.

3.1.3 Le ligand.

Le système bm3lig a été simulé avec un ligand, l'acide palmitoléique, présent dans le canal. La position initiale du ligand est celle de la structure cristallographique 1FAG. Au cours de la dynamique, nous avons étudié les interactions du ligand avec les résidus du canal. Il en résulte que la partie carboxylique du ligand maintient des liaisons hydrogènes avec les résidus Arg47 et Tyr51. Ces interactions sont les mêmes que celles observées par Li et Poulos dans l'étude de la structure cristallographique de BM3 [12]. Le mouvement du domaine F/G amène la Leu 188 en contact direct avec le ligand. Une liaison hydrogène

entre Leu188 et la partie carboxylique de l'acide palmitoléique apparaît en même temps que le domaine se courbe. Ces observations sont en accord avec l'étude de la structure fermée du bm3 (1fag) [12].

L'acide palmitoléique (voir figure en annexe 5.4) est hydroxylé en 3 positions : C13, C14, C15. Ces 3 positions sont hydroxylées respectivement dans 25%, 50% et 25% des cas [19]. Le C16 ne peut être hydroxylé car la Phe87 bloque l'accès à l'hème [12]. On suppose qu'une position est hydroxylée quand elle se trouve à une distance d'environ 7-8Å du fer de l'hème. On peut imaginer que les trois positions vont avoir un mouvement de va et vient au dessus de l'hème. Afin d'étudier ce phénomène, nous avons mesuré les distances entre l'atome de fer et les trois positions précédemment citées. Les histogrammes de la figure 4 montrent le temps que passe chaque carbone à une distance précise de l'hème. Sur la simulation, C13, C14 et C15 sont respectivement 30%, 37% et 44% du temps à une distance comprise entre 7 et 9 Å. Les résultats obtenus sont différents des résultats expérimentaux observés. Ces différences peuvent s'expliquer par le temps trop court de notre simulation.

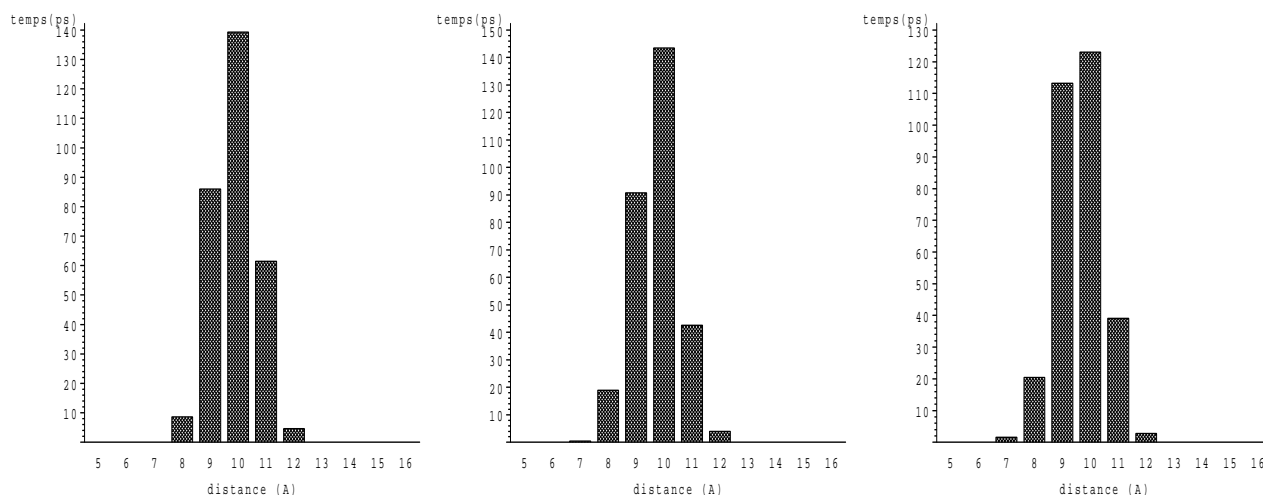


FIG. 4 – **Histogrammes des distances ligand-hème** : De gauche à droite, C13-Fe, C14-Fe et C15-Fe.

La comparaison des résultats des simulations avec les résultats d'études cristallographiques [12, 2] et d'autres simulations sur le BM3 [10, 11] nous a permis de valider le protocole utilisé lors de cette étude.

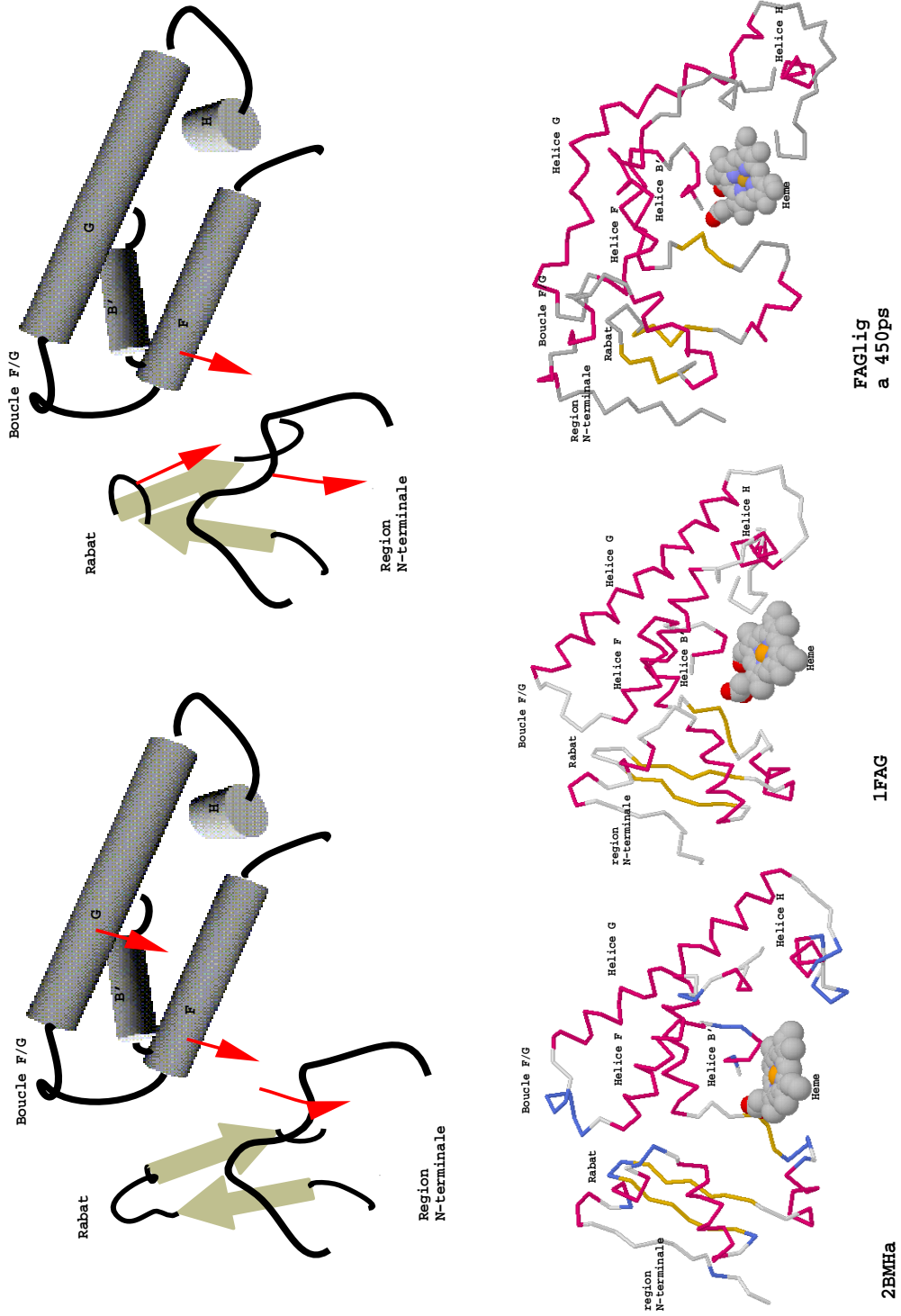


FIG. 5 – **Schéma des mouvements** : en haut les schémas présentent le mouvement des différents domaines, les flèches rouges indiquent le sens du mouvement. En bas trois conformations de BM3, à gauche structure bm3 ouverte, au milieu structure bm3 fermée par le mouvement du domaine F/G, à droite structure à 400ps de bm3lig fermée par la courbure du domaine F/G et du rabat. Seuls les domaines N-terminal(résidus 1-90), F/G (résidus 160-246) et l'hème sont représentés. Les feuillets β sont en jaunes, les hélices α sont en magenta ou en tube, les boucles sont en blancs.

3.2 Les systèmes de C21 (c21 et c21lig).

3.2.1 Étude de l'entrée du canal.

La structure initiale c21 est modélisée à partir de l'état ouvert de bm3. La structure c21lig est modélisée sur l'état fermé de bm3. Cette structure a un canal plus fermé comme le montre la table 6. La minimisation d'énergie engendre uniquement des mouvements négligeables chez c21, alors que la structure c21lig passe dans une conformation proche de celle de c21. Une comparaison des deux structures, après minimisation, montre qu'elles sont identiques. En effet, après superposition des $C\alpha$ des deux structures à partir de leur domaine fixe, le rmsd sur les résidues 26-482 est de 2.56 Å. Le rmsd calculé résidus par résidus (voir figure en annexe 5.5) montre que les différences entre les deux structures sont uniquement situées au niveau des boucles.

temps	d1c21	d2c21	d3c21	d1c21lig	d2c21lig	d3c21lig
modèle initial	9.77	12.80	11.01	7.88	11.92	6.55
après minimisation	9.54	12.89	10.19	9.44	12.70	9.88
max	12.33	13.86	10.32	11.38	13.79	17.69
min	7.67	9.52	4.65	7.54	10.15	10.15
avg	9.26	10.78	7.76	8.99	11.90	13.3
deviation	0.59	0.58	0.99	0.6	0.5	2.04

TAB. 6 – Statistiques sur les distances $d1(C\alpha37-C\alpha207)$, $d2(C\alpha40-C\alpha207)$, $d3(C\alpha64-C\alpha207)$ pour les systèmes C21 et C21lig sur une simulation de dynamique moléculaire de 450 ps .

Le système c21 se ferme dans les 100 premières ps, puis revient à un état moins fermé comme le montre la variation de la distance d3 (voir fig 6). Les distances d1 et d2 restent proches de leur valeur initiale durant toute la simulation. L'étude des différentes conformations du système au cours de la dynamique moléculaire montre que la fermeture du canal est due au mouvement du domaine F/G. Il y a courbure de la région N-terminale de l'hélice G, d3 diminue. La région N-terminale de la protéine s'écarte de l'entrée du canal, d1 et d2 restent constants. La structure reste dans cette conformation durant le reste de la simulation comme l'indique l'écart type et les faibles variations des distances (voir tableau 6). Le système c21 est donc passé dans une conformation plus fermée par rapport à la conformation initiale.

Le système c21lig, contenant un ligand dans le site actif, est au début de la dynamique dans la même conformation que le système c21 comme il a été montré précédemment. Au cours de la simulation, les distances d1 et d2 varient peu comme l'indique la figure 6. Leur valeur moyenne reste proche des valeurs de la structures initiale, et leur écart type est de l'ordre de 0.5. À l'opposé, la distance d3 augmente dans un premier temps fortement pour passer de 9.88 à 17.10 Å puis diminue jusqu'à 11.6 Å à 450 ps (voir fig 6). Les grandes variations de d3 sont dues au mouvement du rabat, région formée par les feuillets β 1.1 et β 1.2, qui s'écarte de l'entrée du canal pour l'ouvrir. d1 et d2 fluctuent très peu car la région N-terminale ainsi que le domaine F/G ne bougent pratiquement pas l'un par rapport à l'autre. La figure 7 représente l'entrée du canal à différents temps de la simulation. A 200 ps le système semble avoir atteint sa conformation la plus ouverte. Il retourne ensuite vers une structure plus fermée comme l'indique l'évolution de la distance d3. On peut supposer que la distance d3 va continuer à diminuer au delà de 450 ps, et la

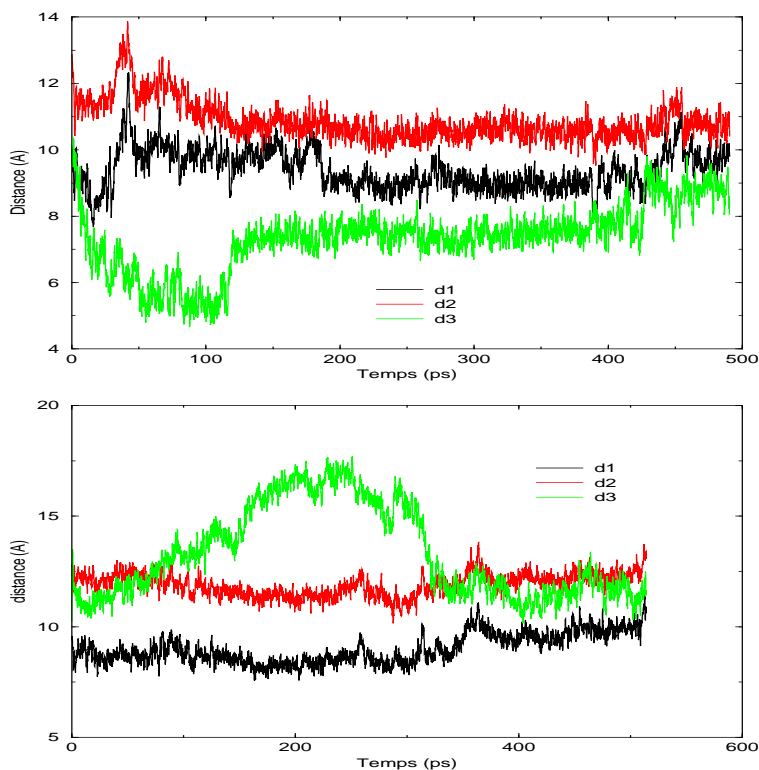


FIG. 6 – Les variations des distances sur les simulations de C21 : C21 en haut, C21lig en bas.

conformation de c21lig convergera vers la conformation fermée de c21. Pour vérifier cette hypothèse, il faudra analyser la suite de la dynamique moléculaire, calculs qui n'ont pas encore été faits.

Après l'étude des deux systèmes de P450C21, c21 et c21lig, construits respectivement à partir de la conformation ouverte et fermée de BM3, on peut estimer que les structures des modèles initiaux sont plus proches d'une conformation fermée qu'ouverte. L'entrée du canal chez c21lig s'ouvre complètement au cours de la dynamique. La structure à 200 ps est la conformation la plus ouverte du P450C21. Le C21 a donc un canal beaucoup plus ouvert comparé à celui de BM3, ce qui n'est pas étonnant puisque le substrat de C21, la progestérone, est un ligand plus encombrant que l'acide palmitoléique (voir figure en annexe 5.4). L'entrée du canal paraît donc s'adapter à la taille du ligand.

3.2.2 L'hélice I.

L'étude de l'hélice I lors de la simulation de c21lig montre que le réseau de liaisons hydrogène normal d'une hélice est perturbé dans la région des résidus 285-297. Cette région correspond à la même région perturbée de l'hélice I chez BM3 (résidus 261-272). Ces deux régions sont très similaires comme le montre la conservation des résidus (voir alignement en annexe 5.3). Tout comme chez BM3, l'hélice va former un coude au niveau de ces résidus sous l'effet de courbure du domaine F/G. Le coude est maintenu par des liaisons hydrogènes entre les résidus Leu 288 et Thr 293. On peut donc supposer que cette région à la même fonction que son homologue chez BM3, c'est à dire qu'elle permet à la molécule de dioxygène de s'approcher de l'hème pour s'y lier [12].

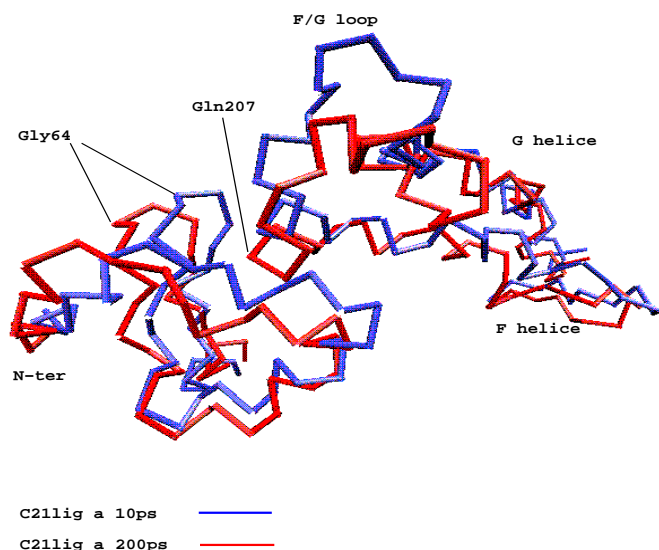


FIG. 7 – Comparaison de la trace de $C\alpha$ dans la région de l’entrée du canal d’accès du substrat entre la structure C21lig à 10 ps (fermée) et la structure C21lig à 200 ps (complètement ouverte). Figure faite avec VMD [20].

3.2.3 Analyse du ligand.

Afin de proposer des résidus importants pour l’amarrage du substrat dans le site actif du C21, les interactions énergétiques du ligand avec les résidus appartenant au canal (voir annexe 5.2) ont été analysées sur la simulation c21lig.

La progestérone interagit avec la région du feuillet β 1.4 par des contacts de Van der Waals. Les résidus Val358, Val359, Pro360, et Leu361 ont des énergies d’interactions favorables avec le ligand. Trois résidus, Arg91, Glu294 et Thr295, sont liés au ligand par des liaisons hydrogène qui sont maintenues tout le long de la simulation. Arg91 est situé à l’entrée du canal sur l’hélice B’, en dessous de hélice F et de la boucle F/G. Ce résidu est aligné avec la Ser72 chez BM3. Ser72 a été proposé par Chang et Loew [11] comme étant le résidu intervenant dans la fixation de l’acide palmitoléique. Glu294 et Thr 295 sont sur l’hélice I juste après la partie C-terminale du coude décrit précédemment. Le ligand est lié par les oxygènes O3 à Arg91, et O20 à Glu294 et Thr295 (voir figure en annexe 5.4 pour la numérotation des atomes de la progestérone). La figure 8 montre que la position C17 (le choix de cette position sera apparent dans la conclusion) et la position C21 reste respectivement à 9 Å et 6 Å de l’hème durant la simulation. On sait que seul la position C21 peut être hydroxylé contrairement à ce qui a été observé chez BM3. Les liaisons hydrogène entre le ligand et les résidus du canal semblent maintenir le substrat en place chez le P450C21 de telle façon qu’une seule position soit hydroxylée spécifiquement.

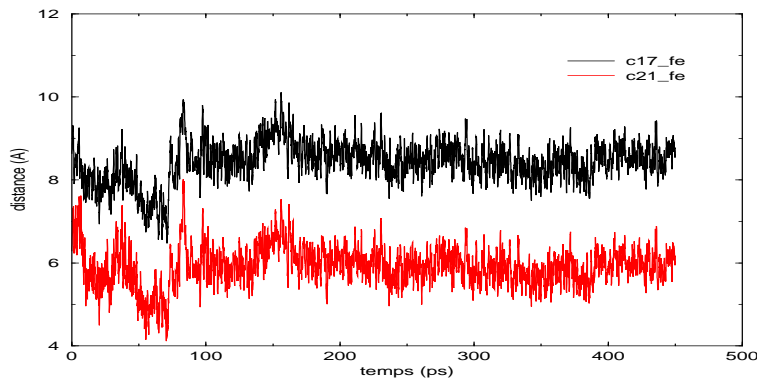


FIG. 8 – Les variations des distances C21-Fe et C17-Fe :

4 Conclusion

Au cours de cette étude, des simulations de dynamique moléculaire de 450ps ont été réalisées à 300K sur 4 systèmes de BM3 et C21, afin d’examiner les propriétés dynamiques et de valider le modèle de P450c21.

La première partie a consisté à étudier la dynamique du P450bm3 en comparant notre analyse avec des simulations effectuées par d’autres [9, 10, 11] et avec des études statiques des structures cristallographiques. Cette étape nous a permis de valider la méthode de simulation employée. Les mouvements observés sont les mêmes que ceux décrits par Li et Poulos [21] et Chang et Loew [11]. Le mouvement du domaine F/G a été retrouvé, tout comme les résidus intervenant dans la fixation du ligand dans le canal.

La suite du travail s’est basée sur les connaissances acquises sur le BM3 pour étudier les mécanismes moléculaires du modèle de cytochrome P450c21. L’étude des dynamiques moléculaires a, dans un premier temps, mis en évidence que les structures modèles de C21 semblent être dans une conformation fermée. En effet, la simulation c21lig montre que le canal s’ouvre énormément. Le canal du C21 a besoin de s’ouvrir beaucoup plus, que le canal de BM3, pour permettre à la progestérone de se fixer dans le site actif. La fermeture et l’ouverture de ce canal résultent des mouvements du domaine F/G, la région N-terminale et du rabat constitué par les feuillets β 1.1 et 1.2, tout comme chez le BM3. L’étude des interactions entre le ligand et les résidus du canal a permis de mettre en évidence des résidus importants dans la fixation du substrat : Les résidus 358-361 forment des interactions de Van der Waals favorables avec le substrat. Les résidus Arg91, Glu294 et Thr 295 sont liés par des liaisons hydrogènes aux oxygènes portés par la progestérone. Ces liaisons, aux deux extrémités du ligand, l’empêche de bouger, si bien qu’un seul site est hydroxylé (la position c21), contrairement au BM3 où le ligand est fixé uniquement par sa partie carboxylique, ce qui permet à trois sites d’être hydroxylés.

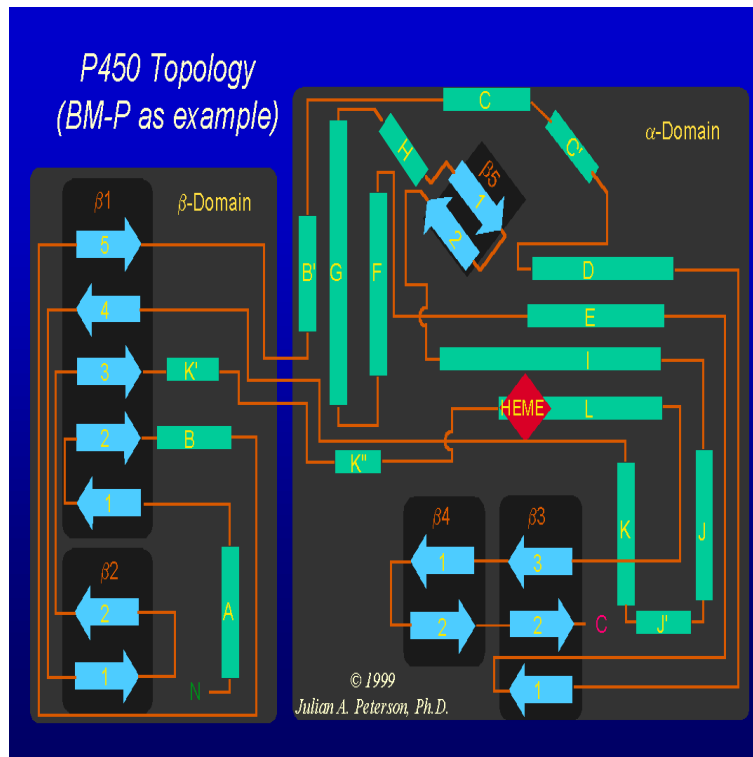
Le cytochrome P450c17, hydroxyle aussi la progestérone, mais uniquement en position C17. Ce cytochrome a 28.9% de résidus conservés par rapport au C21. Il est donc intéressant d’étudier l’amarrage du ligand chez ce cytochrome afin d’essayer de mettre en évidence les résidus qui sont responsables de la différence de spécificité entre le P450c21 et le P450c17. Lin et al [22] ont fait des modèles de ces 2 cytochromes et ont proposé 5 résidus à muter pour que le cytochrome P450C17 acquière l’activité du cytochrome P450C21. Tous leurs mutants furent inactifs. Leurs modèles sont basés sur la structure

de P450cam, qui n'est pas un cytochrome de classe II et après analyse des modèles nous pensons que leurs alignements initiaux sont incorrects. Nous désirons donc tenter le même genre d'expérience à partir de nos modèles. Dans un premier temps, nous allons construire un modèle de C17 pour faire une étude similaire à celle du cytochrome P450C21. Nous referons, dans un second temps, les manipulations faites par Lin et al [22] avec des modèles de C17 et C21 différents des leurs.

Afin de valider les prédictions des résidus intervenant dans la fixation du ligand, nous demanderons à une équipe de biologistes de réaliser des expériences de mutagèneses dirigées sur nos systèmes. Les résultats permettront de confirmer ou de réfuter l'importance dans la fixation de la progestérone des résidus proposés.

5 Annexes

5.1 Organisation des éléments de structure secondaire des cytochromes P450.



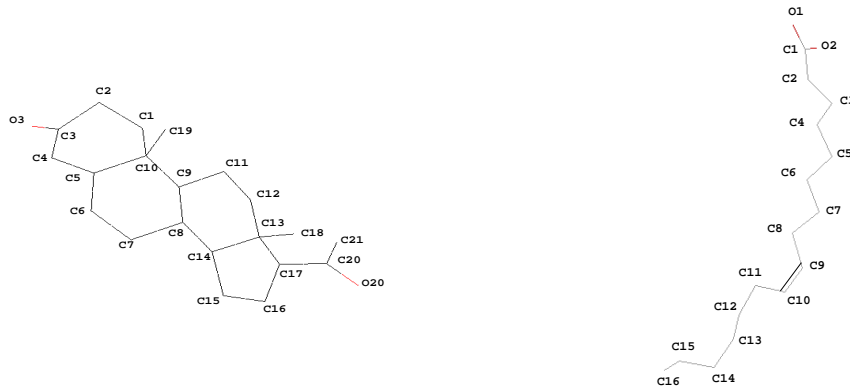
Topologie illustrant les structures secondaires des cytochromes P450 :Les hélices sont représentées par des rectangles vert, les feuillets β par des flèches bleues, et les boucles par des lignes oranges. Les éléments sont groupés en deux domaines comme décrit par Poulos et al [3]. Schéma de Peterson et Graham [23].

5.2 Les résidus formant le canal d'accès chez C21 et BM3.

Structure	C21	BM3	Structure	C21	BM3
hélice A	Leu37	Leu17	hélice F	Glu196	Ala180
	Leu39	Leu19		Tyr190	Ile174
	Gln41	Asn21		Cys193	Met177
	Asp43	Asp23		Val197	Leu181
	Leu44	Lys24		Trp201	Met185
	Pro45	Pro25		Trp204	Leu188
	Ile46	Val26		Ser205	Glu189
				Gln207	Ala191
rabat	His62	Glu43	hélice I	Asp287	Thr260
	Leu63	Ala44		Leu288	Phe261
	Gly64	Pro45		Leu289	Leu262
	Leu65	Gly46		Ile290	Ile263
	Gln66	Arg47		Gly291	Ala264
	Asp67	Val48		Glu294	Glu267
	Val68	Thr49		Thr295	Thr268
hélice B'	Ala89	Asn69	feuillet β 1.4	Val358	Thr326
	Gly90	Leu71		Val359	Ala327
	Arg91	Ser72		Pro360	Pro328
	Pro92	Gln73		Leu361	Ala329
	Glu93	Ala74		Ala362	Phe330
	Pro94	Leu75		Leu363	ser331
	Tyr97	Val78		Pro364	Leu333
	Lys98	Arg79		His365	Tyr334
	Val100	-			
	Asn103	Phe81			
	Tyr104	Ala82			
feuillet β 1.3	Val383	Glu352	feuillet β 4.1	Gln462	Glu267
	Ile385	Met354		pro463	Thr268
	Asn387	Leu356		Leu464	Leu437
	Gln389	Pro358		Pro465	Thr438
			His466	Leu439	

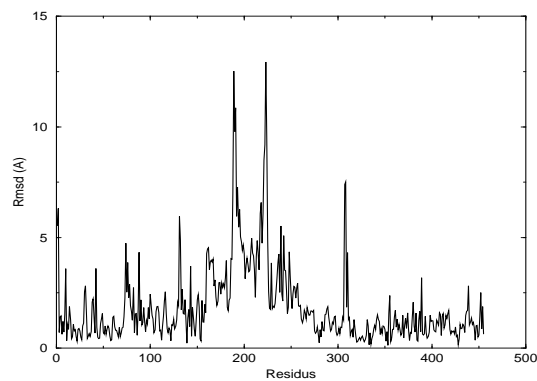
Les résidus du canal chez C21 et leurs homologues chez BM3. Les structures secondaires sont indiquées.

5.4 Structure chimique des ligands.



Les ligands : La progesterone est représentée à gauche, l'acide palmitoléique en à droite.

5.5 Rms résidus par résidus de c21 et c21lig



Comparaisons des structures c21 et c21lig après la minimisation : Rmsd résidu par résidu de la chaîne principale. Calcul fait avec ProFit (A.C.R. Martin, www.biochem.ucl.ac.uk/martin/programs/#profit) en superposant les 2 structures sur leur domaine fixe.

Références

- [1] D.F.V. Lewis and P. Lee-Robichaud. Molecular modelling of steroidogenic cytochromes p450 from families cyp11, cyp17, cyp19 and cyp21 based on the cyp102 crystal structure. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 66 :217–233, 1998.
- [2] K.G. Ravichandran and al. Crystal structure of hemoprotein domain of p450bm-3, a prototype for microsomal p450's. *Science*, 261 :731–736, 1993.
- [3] B.C. Finzel T.L. Poulos and A.J. Howard. A high-resolution crystal structure of cytochrome p450cam. *Journal of Molecular Biology*, 195 :687–700, 1987.
- [4] J.R. Cupp-Vickery and T.L. Poulos. Structure of cytochrome p450eryf involved in erythromycin biosynthesis. *Nature Structural Biology*, 2 :144–153, 1995.
- [5] C.A. Hasemann, K.G. Ravichandran, J.A. Peterson, and J. Deisenhofer. Crystal structure and refinement of cytochrome p450terp at 2.3Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 236 :1169–1185, 1994.
- [6] S.Y. Park and al. Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *Nature Structural Biology*, 1997.
- [7] E. Mornet and J-F. Gibrat. A 3d model of human p450c21 : study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Human Genetic*, 106 :330–339, 2000.
- [8] M-C. Hu, L-C. Hsu, N-C. Hsu, and B-C. Chung. Function and membrane topology of wild type and mutated cytochrome p450c21. *Biochemistry Journal*, 316 :325–329, 1996.
- [9] M.D. Paulsen and R.L. Ornstein. Dramatic differences in the motions of the mouth of open and closed cytochrome p450bm-3 by molecular dynamics simulations. *Proteins*, 21 :237–243, 1995.
- [10] G.E. Arnold and R.L. Ornstein. Molecular dynamics study of time correlated protein domain motions and molecular flexibility :cytochrome p450bm-3. *Biophysical Journal*, 73 :1147–1159, 1997.
- [11] Y-T. Chang and G.H. Loew. Molecular dynamics simulations of p450bm-3, examination of substrate-induced conformational change. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 16(6) :1189–1203, 1999.
- [12] H. Li and T.L. Poulos. The structure of the cytochrome p450bm-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nature structural biology*, 4(2) :140–146, 1997.
- [13] R. Sayle. Rasmol : Molecular visualisation program. 1996.
- [14] D.A. Case and al. Amber 5. *University of California, San Francisco*, 1997.
- [15] W.D. Cornell and al. A second generation force field for the simulation of proteins and nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 117 :5179–5197, 1995.
- [16] K. Hinsén, A. Thomas, and M.J. Field. Analysis of domain motions in large proteins. *submitted*.
- [17] K. Hinsén. Analysis of domain by approximate normal mode calculations. *Proteins*, in print.

- [18] H.J.C Berendsen S. Hayward. Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change ;new results on citrate synthetase and t4 lysozyme. *Proteins, Structure, Function and Genetics.*, 1998.
- [19] Y. Miura and A.J. Fulco. ω -1, ω -2 and ω -3 hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from bacillus megaterium. . *Biochimica et Biophysica Acta*, 388 :305–317, 1975.
- [20] A. Dalke W. Humphrey and K. Schulten. Vmd,visual molecular dynamics. *Journal of Molecular graphics*, 14 :33–38, 1996.
- [21] T.L. Poulos. Conformational dynamics in cytochrome p450-substrate interactions. *Biochimie*, 78 :695–699, 1996.
- [22] D. Lin, L-H. Zhang, E. Chiao, and W.L. Miller. Modeling and mutagenesis of the active site of human p450c17. *Molecular endocrinology*, 8 :392–402, 1994.
- [23] J.A. Peterson and S.E. Graham. A close family resemblance :the importance of structure in understanding cytochromes p450. *Structure*, 6 :1079–1085, 1998.