



Contributions à l'étude de la détoxification de la levure par les transporteurs ABC: 1 - étude biochimique de Yor1p; 2 - rôle des thiols dans la toxicité du sélénium.

Ioana Grigoras

► To cite this version:

Ioana Grigoras. Contributions à l'étude de la détoxification de la levure par les transporteurs ABC: 1 - étude biochimique de Yor1p; 2 - rôle des thiols dans la toxicité du sélénium.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Ecole Polytechnique X, 2005. Français. NNT : . pastel-00001994

HAL Id: pastel-00001994

<https://pastel.hal.science/pastel-00001994>

Submitted on 28 Jul 2010

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.

THESE
pour obtenir le titre de
DOCTEUR de l'ECOLE POLYTECHNIQUE
Discipline : Biologie

présentée et soutenue publiquement par

Ioana Romanita GRIGORAS

le 29 novembre 2005

**Contributions à l'étude de la détoxication de la levure par les
transporteurs ABC :
1 - étude biochimique de Yor1p
2 - rôle des thiols dans la toxicité du sélénium**

Jury composé de

Pr. Sylvain BLANQUET	Président
Pr. Yves GAUDIN	Examineur
Dr. Myriam LAZARD	Co-directeur de thèse
Pr. Marc LE MAIRE	Rapporteur
Dr. Alain LESCURE	Rapporteur
Dr. Pierre PLATEAU	Directeur de thèse

Les transporteurs ABC forment une vaste famille de protéines présentes dans tous les organismes vivants. Ces protéines utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter à travers les membranes biologiques des substances très variées. Plusieurs protéines ABC sont importantes pour la santé humaine. Par exemple, le défaut fonctionnel de la protéine CFTR cause la mucoviscidose et la surproduction de protéine MRP1 est associée aux phénomènes de résistance aux traitements anti-tumoraux. La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède une famille de protéines (Yor1p, Ycf1p, Bpt1p, Ybt1p, Vmr1p, Nft1p) apparentées à CFTR et MRP1. Cette famille peut servir de modèle à l'étude des protéines humaines.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude biochimique de la protéine de levure Yor1p. Nous avons fusionné *YOR1* avec un fragment d'ADN codant un peptide de poly-histidine et avons placé cette construction sous contrôle d'un promoteur permettant une surproduction dans la levure. Nous avons alors montré que la protéine Yor1p poly-histidylée était produite sous forme fonctionnelle dans la levure, puis avons mis au point une méthode permettant de solubiliser puis de purifier cette protéine en une seule étape par chromatographie d'affinité sur une colonne greffée avec des ions métalliques.

La deuxième partie de ce travail a consisté à produire sous forme isolée chez la bactérie *Escherichia coli* et à purifier à homogénéité les deux domaines de Yor1p impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Nous avons étudié la fixation de l'ATP sur ces deux domaines, ce qui nous a permis de conclure que ces domaines étaient bien structurés. Ils peuvent maintenant être utilisés pour des études structurales.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle la protéine Ycf1p dans la détoxification du sélénite. Nous avons observé que la toxicité du sélénite pour la levure était considérablement accrue par la présence de composés thiolés dans le milieu de culture. La formation de dérivés réactifs de l'oxygène est vraisemblablement à l'origine de cette hypertoxicité.

The ABC-proteins form a large family of proteins present in all the living organisms. These proteins use the energy of ATP hydrolysis to transport a wide range of substances across biological membranes. In humans, some of these proteins have significant implications in pathology. For example, dysfunction of CFTR causes cystic fibrosis, and the overproduction of MRP1 is often associated with multidrug resistance phenomena. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a cluster of 6 proteins (Yor1p, Ycf1p, Bpt1p, Ybt1p, Vmr1p, Nft1p) homologous to CFTR and MRP1. This family can thus serve as a model for the study of human proteins.

The first part of this work was a biochemical study of the yeast protein Yor1p. We added a histidine tag to the *YOR1* gene and placed this construction under the control of a promoter allowing an overproduction in yeast. We showed that the histidine tagged Yor1p was produced in a functional form and, subsequently, we developed a method allowing the solubilization and the purification of Yor1p in a single step by metal affinity chromatography. In a second part of this work, we produced in an isolated form in *Escherichia coli* the two NBD domains of Yor1p that are involved in ATP binding and hydrolysis and purified them to homogeneity. We studied ATP binding to these two domains, and were able to conclude that these domains are well structured. Thus, they can now be used for structural studies.

Finally, we considered the role of Ycf1p in selenite detoxification. We observed that the selenite toxicity for yeast was considerably increased in the presence of thiols. The formation of reactive oxygen species is probably at the origin of this hypertoxicity.

Je tiens à remercier ici tous ceux qui ont eu un rôle déterminant dans la réalisation de ce travail de thèse, en mettant à ma disposition leurs compétences scientifiques et leur soutien humain.

Je remercie tout d'abord le Professeur Sylvain Blanquet pour m'avoir accueillie et encouragée au sein du Département de Biologie de l'Ecole Polytechnique. Ses conseils avisés ont été déterminants pour la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du jury de soutenance de cette thèse : au Professeur Marc Le Maire et au Docteur Alain Lescure pour s'être acquittés de la lourde tâche de rapporteurs, au Professeur Yves Gaudin pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail et au Professeur Sylvain Blanquet pour avoir présidé le jury. Je voudrais également remercier le Professeur Yves Gaudin pour les discussions fructueuses que nous avons eues au cours de la préparation de cette thèse.

Ma première pensée est bien sûr pour mes directeurs de thèse, Pierre Plateau et Myriam Lazard, sans lesquels ce travail ne serait pas ce qu'il est. Je les remercie de m'avoir fait bénéficier de leurs connaissances et leurs compétences. Grâce à eux, j'ai eu l'occasion de rentrer pleinement dans le monde de la recherche en biochimie. Ils m'ont montré que tout avait son importance dans la mise en œuvre d'une expérience : l'habileté, la rigueur, l'imagination et surtout la persévérance.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à Marc Dauplais pour sa contribution à ce travail de thèse, ainsi que pour les très agréables conversations non-scientifiques. Mes remerciements vont aussi aux autres qui ont travaillé un jour sur les protéines ABC : à Olivier Gueldry pour l'initiation dans les secrets des Mac OS, à Florence Delort pour sa bonne humeur et à Thanh Ha Duong pour le chocolat quotidien. Je souhaite bonne chance aux nouveaux arrivants : Romary Perrin et Agathe Tarze pour le travail sur le sélénium dans lequel ils s'engagent.

J'exprime mes remerciements à Messieurs Jean-Pierre Le Caer et de Guillaume Van Der Rest du Laboratoire DCMR de l'Ecole Polytechnique pour leur aide et leur disponibilité.

Je voudrais aussi remercier Codjo Hountondji pour avoir été un très agréable voisin de bureau pendant plus de 5 ans.

Je remercie tout les autres thésards du laboratoire, présents et passés, pour avoir fait avec moi un bout de thèse ensemble : Julie Soutourina, Olivier Gueldry, Thibault Crepin, Lionel Vial, Laure Yatime, Laurent Guillon, Laurent Giorgi, Guillaume Launay, Josselin Noirel, Anne Lopes, Alexey Aleksandrov, ainsi que les post-doctorants de passage, Olga Soutourina, Thanh Ha Duong, Romary Perrin, Agathe Tarze, Damien Thompson, Pablo Tortosa, Marcel Schmidt. Parmi eux, je remercie tout particulièrement Laure Yatime avec laquelle j'ai partagé les moments les plus durs de la rédaction (le mois d'août) et qui a toujours eu un mot gentil d'encouragement et une tablette de chocolat.

Je remercie vivement le secrétariat : Catherine Teillet (ma voisine), Françoise Humbert et Cathérine Morais pour leur gentillesse et disponibilité, ainsi qu'Elisabeth Motta et Marcel Coué.

Je dis aussi un grand merci Laura Fioni pour sa présence, sa sympathie et pour m'avoir toujours encouragée dans les moments difficiles. Je tiens également à remercier Emma Schmitt et Yves Mechulam pour leur bonne humeur, leur joie de vivre et leurs conseils scientifiques.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres du Laboratoire de Biochimie, anciens et actuels, pour les cours de langue française, et notamment, Christine Lazennec, Michel Panvert, Annick Carpentier, Pascal Delplanche, François Cluzeau, Michel Fromant, Guillaume Heugas, ainsi qu'Alfonso Jaramillo, Eric Madigou et David Mignon. Merci aussi à Thomas Simonson pour ses conseils en anglais.

Je remercie enfin tous les amis de LOB : Latifa, Eric, Clément, Sébastien, Ursula, Andreea et du PMC : Anne-Marie, Anne, Teodora et les autres qu'on croise dans le couloir.

Sur un plan personnel, je tiens à remercier Horia pour son amour, son amitié, son soutien quotidien et sa patience. Merci à mes parents, à ma sœur et à mes amis pour leur amour, leur foi et leurs e-mails.

À ma famille

Sommaire

Résumé	1
Abstract	2
Remerciements	3
Sommaire	5
Liste des figures	9
Liste des tableaux	14
Liste des abréviations	15
Introduction	17
<u>Les protéines ABC</u>	17
<u>Organisation générale des protéines ABC</u>	18
<u>Motifs caractéristiques des protéines ABC</u>	20
<u>Structure des protéines ABC</u>	22
<u>Structure des domaines NBD</u>	24
<u>Interactions entre les domaines NBD</u>	27
<u>Structure des transporteurs ABC entiers</u>	31
<u>Mécanisme d'action des transporteurs ABC</u>	40
<u>Le fonctionnement des domaines NBD</u>	41
<u>Le rôle des domaines TMD</u>	45
<u>Mécanisme de couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et le transport des substrats par les protéines ABC</u>	47
<u>Intérêt de la levure comme organisme modèle pour l'étude des protéines ABC</u>	56

Chapitre I : Étude de la protéine Yor1p 65

<u>Expression fonctionnelle de Yor1p dans la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	65
<u>Le système d'expression</u>	65
<u>Préparations d'extraits de membranes plasmiques</u>	67
<u>Analyse fonctionnelle <i>in vivo</i> des souches produisant les protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀</u>	68
<u>Transport actif de la rhodamine B</u>	70
<u>Analyse phénotypique des souches surproduisant la protéine Yor1p</u>	71
<u>Purification des protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀</u>	75
<u>Solubilisation des protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ par le <i>n</i>-dodécyl-β-D-maltoside et purification de ces protéines par chromatographie d'affinité</u>	75
<u>Caractérisation de la protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée</u>	78
Activité ATPasique	78
Analyse de l'état d'oligomérisation de la protéine Yor1p-(His) ₁₀ purifiée	80
<u>Essais d'amélioration de l'état de la protéine après la purification</u>	81
Solubilisation et purification en présence d'autres détergents	81
Solubilisation et purification en présence des lipides	83
<u>Activité des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ dans des extraits de membranes plasmiques</u>	84
<u>Marquage par le 8-azido-[α-³²P]ATP</u>	84
<u>Mesure de l'activité ATPasique</u>	86
<u>Étude des mutants E1392Q et H1423R de la protéine Yor1p</u>	89
<u>Caractérisation de l'activité ATPasique des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ dans des extraits de membranes plasmiques</u>	94
<u>Effet des substrats sur l'activité des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ dans des extraits de membranes plasmiques</u>	95
<u>Discussion</u>	98

Chapitre II : Étude des domaines NBD1 et NBD2 de Yor1p 101

<u>Production et purification des domaines NBD1 et NBD2 de Yor1p</u>	101
--	-----

<u>Définition de limites des domaines NBD</u>	101
<u>Purification des domaines NBD</u>	104
<u>Activité des domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p</u>	105
<u>Interaction avec des nucléotides</u>	105
Marquage par le 8-azido-[α - ³² P]ATP	106
Interaction avec le TNP-ATP, un dérivé fluorescent de l'ATP	107
<u>Activité ATPasique et dimérisation des domaines NBD1 et NBD2</u>	110
<u>Discussion</u>	111
 Chapitre III : Rôle des thiols dans la toxicité du sélénium	115
<u>Effet des thiols sur la toxicité du sélénite pour la levure</u>	117
<u>Rôle de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans la toxicité du sélénite pour la levure</u>	120
<u>Discussion</u>	124
 Conclusion	127
 Matériels et méthodes	131
<u>Matériels</u>	131
<u>Techniques générales de biochimie et de biologie moléculaire</u>	137
<u>Constructions des souches de levure</u>	143
<u>Clonage des domaines NBD de la protéine Yor1p dans le vecteur pET15blpa</u>	148
<u>Autres méthodes utilisées</u>	149
 Annexes	163
 Références bibliographiques	173

Liste des figures et des tableaux

Introduction

Figure 1.	Organisation en domaines des transporteurs ABC.	19
Figure 2.	Modèle proposé pour l'organisation sous forme des domaines de la protéine Ycf1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	20
Figure 3.	Organisation générale d'un domaine NBD.	20
Figure 4.	Structure de la protéine HisP de <i>Salmonella typhimurium</i> complexée à l'ATP.	25
Figure 5.	Schéma des interactions entre la protéine HisP et l'ATP.	27
Figure 6.	Représentations schématiques et exemples de structures de dimères de NBD.	28
Figure 7.	Interaction de la protéine MJ0796(E171Q) avec l'ATP.	30
Figure 8.	Structure des protéines MsbA d' <i>Escherichia coli</i> , de <i>Vibrio cholera</i> et de <i>Salmonella typhimurium</i> .	32
Figure 9.	Représentation schématique de la structure dimérique des protéines MsbA d' <i>Escherichia coli</i> , de <i>Vibrio cholera</i> et de <i>Salmonella typhimurium</i> .	33
Figure 10.	Structure des protéines BtuCD et BtuF d' <i>Escherichia coli</i> .	34
Figure 11.	Vue détaillée de l'interaction entre la boucle L de BtuC et les résidus qui entourent la boucle Q de BtuD.	36
Figure 12.	Structure de la P-glycoprotéine de hamster à une résolution de ~25 Å.	37
Figure 13.	Structure tridimensionnelle de la P-glycoprotéine sous forme libre ou complexée à l'AMP-PNP-Mg ²⁺ .	38
Figure 14.	Structure tridimensionnelle de la P-glycoprotéine complexée à l'AMP-PNP-Mg ²⁺ à une résolution de ~8 Å.	39
Figure 15.	Le "modèle d'hydrolyse alternative de l'ATP au niveau des deux NBD".	49
Figure 16.	Le "modèle d'hydrolyse alternative de l'ATP au niveau des deux NBD" révisé par le laboratoire de S. V. Ambudkar.	52
Figure 17.	Le modèle "ATP switch".	55
Figure 18.	Arbre phylogénétique des protéines ABC humaines et de levure.	57

- Figure 19. Arbre phylogénétique des protéines ABC humaines appartenant à la sous-famille ABCC et des protéines de levure apparentées. 58

Chapitre I

- Figure 20. Principe de la construction des souches produisant la protéine Yor1p étiquetée avec un peptide de poly-histidine à son extrémité 3'-terminale. 66
- Figure 21. Analyse d'extraits de membrane de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. 68
- Figure 22. Effet de l'oligomycine et de la rhodamine B sur la croissance des souches AD1-8, SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae*. 69
- Figure 23. Exportation de la rhodamine B par les souches AD1-8, SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae*. 71
- Figure 24. Formules chimiques des produits dont l'effet sur la croissance des levures a été étudié. 74
- Figure 25. Purification de Yor1p-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺, à partir d'un extrait brut des protéines membranaires. 77
- Figure 26. Purification de Yor1p-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺, à partir d'un extrait des protéines membranaires. 78
- Figure 27. Analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide dénaturants d'échantillons de Yor1p-(His)₁₀ traités des différentes façons avant d'être appliqués sur gel. 81
- Figure 28. Purification de Yor1p-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺ à partir d'un extrait des protéines membranaires solubilisé par le DM. 82
- Figure 29. Purification de Yor1p-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺ en présence de lipides d'*Escherichia coli*. 83
- Figure 30. Marquage par le 8-azido-[α -³²P]ATP d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. 85

Figure 31.	Activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His) ₆ et SUPERYOR-(His) ₁₀ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	87
Figure 32.	Effet du vanadate sur l'activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His) ₆ et SUPERYOR-(His) ₁₀ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	89
Figure 33.	Analyse d'extraits de membrane de différentes souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.	90
Figure 34.	Exportation de la rhodamine B par des cellules des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR-(His) ₁₀ , SUPERYOR-(His) ₁₀ E1392Q et SUPERYOR-(His) ₁₀ H1423R de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	92
Figure 35.	Marquage d'extraits de membranes plasmiques de différentes souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> par le 8-azido-[α - ³² P]ATP et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.	93
Figure 36.	Effet de différents substrats potentiels sur l'activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques de la souche SUPERYOR.	96
Figure 37.	Marquage par le 8-azido-[α - ³² P]ATP d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir de la souche SUPERYOR et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.	98

Chapitre II

Figure 38.	Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide d'extraits bruts de souches d' <i>Escherichia coli</i> produisant les domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p.	103
Figure 39.	Purification du domaine NBD2 de la protéine Yor1p par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co ²⁺ et par filtration sur une colonne Superdex 75, à partir d'un extrait brut des protéines cytoplasmiques.	104
Figure 40.	Filtration HPLC des domaines NBD1 et NBD2 sur une colonne de TSK G3000SW _{XL} .	105

Figure 41.	Marquage des domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p par le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.	106
Figure 42.	Spectre de fluorescence du TNP-ATP.	107
Figure 43.	Fixation du TNP-ATP sur les domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p.	108
Figure 44.	Déplacement du TNP-ATP fixé sur les domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p par l'addition de concentrations croissantes d'ATP.	109
Figure 45.	Filtration HPLC sur une colonne de TSK G3000SW _{XL} d'un mélange équimolaire des domaines NBD1 et NBD2 en absence ou en présence de 50 μM d'ATP ou de 50 μM d'ATP-Mg ²⁺ .	111

Chapitre III

Figure 46.	Effet de sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en absence ou en présence de 120 ou 400 μM de glutathion.	117
Figure 47.	Effet du glutathion sur la toxicité du sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	118
Figure 48.	Effet du sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en absence ou en présence de 400 μM de cystéine.	119
Figure 49.	Effet du sélénodiglutathion sur la croissance de la souche DTY7 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en absence ou en présence 400 μM de glutathion.	120
Figure 50.	Cascade de réactions chimiques entre le sélénite et le glutathion.	121
Figure 51.	Réduction du MTS.	122
Figure 52.	Evolution, en fonction du temps, de l'effet d'un mélange sélénite-glutathion sur la croissance de la souche DTY7 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	123
Figure 53.	Effet de sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en présence de 200 μM de glutathion et en absence ou en présence de CuSO_4 ou de ZnSO_4 à des concentrations finales de 1 μM , 3 μM , 10 μM ou 50 μM .	124

Matériels et méthodes

Figure 54. Construction des souches SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ de 146
Saccharomyces cerevisiae.

Introduction

Tableau 1.	Structures à haute résolution de domaines NBD de protéines ABC ou de protéines apparentées.	22
Tableau 2.	Structures à haute, moyenne ou faible résolution de protéines ABC entières ou de protéines apparentées.	24

Chapitre I

Tableau 3.	Effet de différents produits toxiques sur la croissance des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His) ₆ et SUPERYOR-(His) ₁₀ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	73
Tableau 4.	L'effet des divers composés sur l'activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His) ₆ et SUPERYOR-(His) ₁₀ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	88
Tableau 5.	Effet de différents produits toxiques sur la croissance des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR-(His) ₁₀ , SUPERYOR-(His) ₁₀ E1392Q et SUPERYOR-(His) ₁₀ H1423R.	91

Chapitre II

Tableau 6.	Les segments pouvant correspondre à chacun des deux NBD de la protéine Yor1p.	102
Tableau 7.	Constantes de dissociation des complexes formés entre les domaines NBD de Yor1p et l'ATP, le GTP, le CTP et l'UTP.	109

Matériels et méthodes

Tableau 8.	Les amorces utilisées pour les amplifications par PCR des différents fragments d'ADN visant à produire chez <i>Escherichia coli</i> les domaines NBD1 et NBD2.	148
------------	--	-----

Liste des abréviations

ABC :	<i>ATP-Binding Cassette</i> , cassette fixant l'ATP
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	adénosine 5'-triphosphate
BET :	bromure d'éthidium
BSA :	sérumalbumine bovine
CFTR :	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CTP :	cytidine 5'-triphosphate
D.O. :	densité optique
Da :	Dalton (unité de masse - un dalton représente le douzième de la masse d'un atome de carbone 12, soit $1,66 \cdot 10^{-24}$ g)
dATP :	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
DCC :	<i>N,N'</i> -di-cyclohexyl-carbodiimide
dCTP :	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP :	2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate
DM :	<i>n</i> -dodécyl- β -D-maltoside
dNTP :	désoxyribonucléoside-5'-triphosphate
DOC :	désoxycholate
DTT :	dithiothréitol
dTTP :	2'-désoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA :	éthylène-diamine-tétra-acétate
GSH :	glutathion réduit
GSSG :	glutathion oxydé
GTP :	guanosine 5'-triphosphate
HEPES :	acide N-(hydroxy-2-éthyl)-piperazine N'-2-éthane sulfonique
IPTG :	isopropyl- β -D-thiogalactoside
LPG :	lysophosphatidylglycérol
LS :	<i>n</i> -lauroyl-sarcosine
MRP :	<i>Multidrug Resistance Associated Protein</i>

MTS :	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium
NDB :	<i>Nucleotide-Binding Domain</i> , domaine fixant des nucléotides
NEM :	N-éthylemaléimide
NTA :	nitrilotriacétate
NTP :	nucléoside-5'-triphosphate
OG :	<i>n</i> -octyl- β -D-glucopyranoside
pCMPS :	<i>p</i> -chloro-mercuriphényl sulfonate
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne
PEG :	polyéthylène glycol
P-gp :	P-glycoprotéine
PMSF :	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PNK :	polynucléotide 5'-hydroxyle-kinase
ROS :	<i>Reactive Oxygen Species</i> , dérivés réactifs de l'oxygène
SDS :	dodécylsulfate de sodium
TEMED :	N,N,N',N'-tétraméthylènediamine
TMD :	<i>Transmembrane Domain</i> , domaine transmembranaire
TNP-ATP :	2'-(ou-3')-O-(2, 4, 6-trinitrophényl)-adénosine 5'-triphosphate
Tris :	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UTP :	uridine 5'-triphosphate
YCF1 :	<i>Yeast Cadmium Factor 1</i>
YOR1 :	<i>Yeast Oligomycin Resistance 1</i>

Introduction

Les protéines ABC

Les "protéines ABC" ("*ATP-Binding Cassette*") composent une des plus vastes familles de protéines. Elles sont présentes dans tous les organismes procaryotes, eucaryotes et archéens et elles y jouent un rôle essentiel (Holland *et al.*, 2003).

En 1986, lorsque cette famille fut identifiée, elle ne comptait que quelques protéines (Higgins *et al.*, 1986). Vingt ans après, le séquençage complet des génomes a révélé la présence d'environ 80 protéines ABC chez la bactérie *Escherichia coli* K-12 (Blattner *et al.*, 1997), 18 chez *Pyrococcus abyssi* (Albers *et al.*, 2004), 29 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Decottignies et Goffeau, 1997), 129 chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001) et 49 chez l'homme (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>, Dean *et al.*, 2001a, b).

La plupart de ces protéines sont des transporteurs transmembranaires, mais certaines d'entre elles sont des canaux ioniques, des régulateurs de canaux, des récepteurs, des facteurs d'élongation de la traduction, des protéines impliquées dans la biogenèse du ribosome, Pour réaliser ces fonctions, elles utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP.

Les transporteurs ABC peuvent transloquer à travers les membranes biologiques des substances de structures et de dimensions très différentes : ions, sucres, acides biliaires, acides aminés, peptides, phospholipides, stéroïdes, vitamines, pigments, mycotoxines, antibiotiques, mais aussi des médicaments, des lipopeptides et des protéines de grande taille (>100000 Da). Ainsi, elles sont impliquées dans des processus cellulaires divers comme la maintenance de l'homéostasie osmotique, l'importation des nutriments, la résistance aux xénobiotiques, l'immunité bactérienne, la division cellulaire, la sporulation, la présentation d'antigènes. Chez les eucaryotes, ces transporteurs sont des exportateurs, alors que chez les procaryotes et les archées, ce sont aussi bien des exportateurs que des importateurs.

L'importance de cette classe de protéines est due au fait qu'elles sont associées à des processus cellulaires importants, mais aussi à des problèmes cliniques. Plusieurs maladies génétiques humaines sont causées par des mutations dans les gènes de protéines ABC : la mucoviscidose (CFTR /ABCC7) (Riordan *et al.*, 1989), l'adrénoleucodystrophie (ALDP /ABCD1) (Mosser *et al.*, 1993), le syndrome de Zellweger (PMP70 /ABCD3) (Gartner *et al.*, 1992),

l'hypoglycémie hyperinsulinémique infantile (SUR1 /ABCC8) (Thomas *et al.*, 1995), le syndrome de Dubin-Johnson (MRP2 /cMOAT /ABCC2) (Paulusma *et al.*, 1996, Büchler *et al.*, 1996), par exemple. Grâce à leur capacité à fonctionner comme transporteurs de médicaments, ces protéines sont également impliquées dans les processus de résistance multiple des cellules cancéreuses aux traitements anti-tumoraux (P-gp /MDR1 /ABCB1, MRP1 /ABCC1) (Chen *et al.*, 1986, Cole *et al.*, 1992). Quelques maladies parasitaires, comme la malaria (pfMDR) (Cowman *et al.*, 1991), certaines amibiases (EhPgp) (Orozco *et al.*, 2002), les leishmanioses viscérales (ltgpgA) (Callahan et Beverley, 1991) et bactériennes (*Staphylococcus aureus* (MsrA) (Ross *et al.*, 1990), *Streptomyces* (DrrAB et TlrC) (Guilfoile et Hutchinson, 1991, Rosteck *et al.*, 1991)) sont aussi aggravées par le fait que les organismes infectieux produisent des protéines ABC qui leur permettent de résister aux médicaments.

Organisation générale des protéines ABC

Du point de vue structural, toutes les protéines ABC contiennent deux domaines NBD (*nucleotide-binding domain*), qui lient et hydrolysent l'ATP. Chez les transporteurs ABC, ces deux domaines sont situés au voisinage de la membrane, du côté cytoplasmique. Les transporteurs ABC contiennent également deux domaines transmembranaires (TMD) qui forment un canal à travers la membrane.

Chez les eucaryotes, ces protéines sont exprimées soit sous la forme d'un polypeptide unique comprenant les deux domaines NBD et les deux domaines TMD, soit comme des demi-transporteurs comprenant un domaine NBD et un domaine TMD qui forment des homo- ou des hétérodimères pour constituer un transporteur ABC fonctionnel. C'est le cas, par exemple, chez l'homme, des protéines TAP1 et TAP2 (Kelly *et al.*, 1992).

Chez les procaryotes, les quatre domaines sont souvent exprimés individuellement (ex. le transporteur de l'histidine de *Salmonella typhimurium* (Kerppola *et al.*, 1991)), mais ils peuvent aussi être fusionnés génétiquement d'une manière variable.

Les protéines ABC des archées sont généralement des hétérotétramères et les gènes qui codent les différentes sous-unités sont souvent regroupés sur le chromosome (Albers *et al.*, 2004) (figure 1).

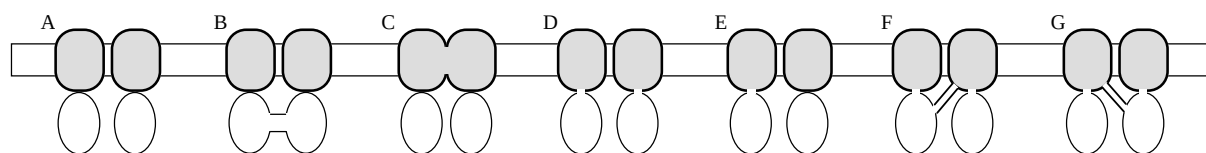


Figure 1. Organisation en domaines des transporteurs ABC (adapté d'après Linton et Higgins, 1998). Les transporteurs ABC contiennent deux domaines NBD (ovales blancs) et deux domaines TMD (rectangles gris). Les deux domaines NBD peuvent être des homo- ou des hétérodimères. Les deux domaines TMD peuvent être également des homo- ou des hétérodimères. A. Les quatre domaines sont exprimés individuellement (ex. le transporteur de l'histidine HisQMP₂ de *Salmonella typhimurium* (Kerppola *et al.*, 1991)). B. Les deux domaines NBD sont fusionnés génétiquement et les deux domaines TMD sont exprimés individuellement (ex. le transporteur de la ribose RbsC₂A d'*Escherichia coli* (Barroga *et al.*, 1996)). C. Les deux domaines NBD sont exprimés individuellement et les deux domaines TMD sont fusionnés génétiquement (ex. le transporteur de Fe³⁺-hydroxamate FhuCB d'*Escherichia coli* (Fecker et Braun, 1983)). D. Un domaine NBD est fusionné génétiquement avec un domaine TMD et le transporteur est soit un homodimère (ex. la protéine LmrA d'*Escherichia coli* (van Veen *et al.*, 1996)), soit un hétérodimère (ex. la protéine TAP humaine (Kelly *et al.*, 1992)). E. Un domaine NBD est fusionné génétiquement avec un domaine TMD, le deuxième domaine NBD et le deuxième domaine TMD sont exprimés individuellement (ex. la protéine YhiGHI d'*Escherichia coli* (Linton et Higgins, 1998)). F. Les quatre domaines sont fusionnés génétiquement dans l'ordre : TMD1-NBD1-TMD2 - NBD2 (ex. la P-glycoprotéine humaine (Chen *et al.*, 1986)). G. Les quatre domaines sont fusionnés génétiquement dans l'ordre : NBD1-TMD1-NBD2-TMD2 (ex. la protéine Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* (Balzi *et al.*, 1994)).

En plus des deux NBD et des deux TMD, certains transporteurs ABC contiennent d'autres domaines. Comme exemples, on peut citer le domaine régulateur R des protéines CFTR et Ycf1p ou le domaine N-terminal additionnel, vraisemblablement transmembranaire, des protéines Ycf1p et MRP1 (figure 2) (Klein *et al.*, 1999, Decottignies et Goffeau, 1997). Chez les procaryotes et les archées, tous les transporteurs impliqués dans l'importation des nutriments interagissent avec une protéine localisée à l'extérieur du cytoplasme qui lie le substrat et le présente au transporteur (PBP, *periplasmic binding protein*). Chez les archées et les bactéries à Gram positif, cette protéine est ancrée dans la membrane plasmique grâce à une queue hydrophobe (Albers *et al.*, 2004, Gilson *et al.*, 1988). Chez les bactéries à Gram négatif, cette protéine se retrouve libre dans l'espace périplasmique (Tam et Saier, 1993). Dans certains transporteurs bactériens, une protéine PBP est fusionnée génétiquement à chaque domaine TMD. C'est le cas du transporteur de la bétaine OpuA /BusA de *Lactococcus lactis* (Obis *et al.*, 1999, van der Heide et Poolman, 2000).

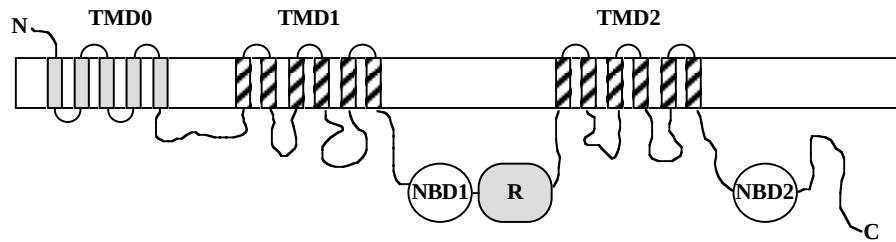


Figure 2. Modèle proposé pour l'organisation en domaines de la protéine Ycf1p de *Saccharomyces cerevisiae* (TMD, *transmembrane domain* ; NBD, *nucleotide-binding domain*; R, domaine régulateur) (d'après Falcon-Perez *et al.*, 1999 et Hipfner *et al.*, 1997).

Motifs caractéristiques des protéines ABC

Les protéines ABC sont définies par la présence du domaine NBD (l'"unité ABC" ou la "mini" protéine) formé de 200-250 acides aminés et impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Ce domaine contient 5 motifs peptidiques conservés : Walker A, Walker B, "signature ABC", boucle Q et boucle H (figure 3).

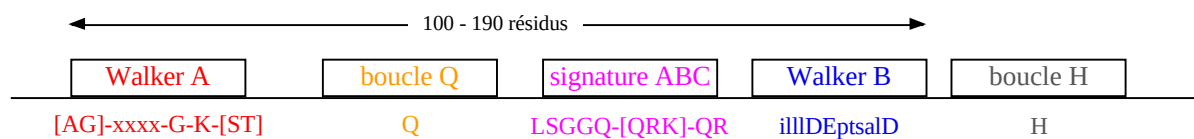


Figure 3. Organisation générale d'un domaine NBD.

Les motifs Walker A et Walker B, identifiés en 1982 par Matti Saraste (Walker *et al.*, 1982), se retrouvent dans de nombreuses protéines fixant des nucléotides. Lorsque ces deux motifs sont présents, le Walker A est toujours situé en amont du Walker B. Dans les protéines ABC, la distance entre ces deux motifs varie de 100 à 190 résidus (Saurin *et al.*, 1999).

Le Walker A (ou motif "P-loop") a été défini sous la forme G-xxxx-G-K-T-xxxxxx-[IV] par Walker (les acides aminés acceptés pour une position donnée sont indiqués entre crochets, x désigne un acide aminé quelconque). Aujourd'hui, dans la banque de données ProSite (<http://www.expasy.org/prosite/>), la séquence consensus proposée pour ce motif est [AG]-xxxx-G-K-[ST]. Pour les protéines ABC, Schneider et Hunke (1998) proposent la séquence G-xx-G-x-G-K-[ST].

Le Walker B est plus variable. Il a été défini par Walker sous la forme [RK]-xxx-G-xxx-L-hhhh-D (où h désigne un acide aminé hydrophobe). Aujourd'hui, il est généralement admis

qu'une séquence hhhh-D peut correspondre à un motif Walker B. Chez les protéines ABC, le résidu situé juste après l'aspartate (un Glu) est aussi très conservé (Decottignies et Goffeau, 1997), ainsi que d'autres résidus situés en aval du Walker B, dans une région appelée boucle D. Tous ces résidus forment ensemble le "Walker B étendu", dont la séquence consensus proposée par Saurin *et al.* est illlDEptsalD (Saurin *et al.*, 1999) (les acides aminés moins conservés sont en minuscules).

La "signature ABC" (appelée aussi le peptide lien ou motif "C") est spécifique des protéines ABC (Hyde *et al.* 1990). Elle a jusqu'à 15 acides aminés de long et commence généralement par LSGGQ. Une séquence consensus de la forme LSGGQ-[QRK]-QR a été proposée par Schneider et Hunke (1998). Dans la banque de données ProSite (<http://www.expasy.org/prosite/>), la séquence de la signature ABC est donnée sous la forme : [LIVMFYC]-[SA]-[SAPGLVFYKQH]-G-[DENQMW]-[KRQASPCLIMFW]-[KRNQSTAVM]-[KRACLVM]-[LIVMFYPAN]-{PHY}-[LIVMFW]-[SAGCLIVP]-{FYWHP}-{KRHP}-[LIVMFYWSTA] (les acides aminés acceptés à une position donnée sont indiqués entre crochets, les acides aminés non acceptés à une position donnée sont indiqués entre accolades).

La boucle H est formée autour d'une histidine localisée à une trentaine de résidus après le Walker B, dans la région "switch" (Decottignies et Goffeau, 1997). Elle est normalement précédée par quatre acides aminés hydrophobes et suivie par un acide aminé chargé.

La boucle Q est formée par les résidus situés après une glutamine très conservée localisée entre le Walker A et la "signature ABC" (Hyde *et al.* 1990, Decottignies et Goffeau, 1997).

Les transporteurs ABC contiennent également deux domaines transmembranaires (TMD). Fréquemment, il y a six segments α -hélicoïdaux par domaine et un total de 12 par transporteur entier, mais des variations ont été observées. Du point de vue de la séquence, ces domaines sont plus variables que les domaines NBD, ce qui est en accord avec la supposition qu'ils déterminent la spécificité de substrat de la protéine ABC. On trouve, cependant, un motif peptidique faiblement conservé dans certains transporteurs ABC : le motif "EAA" (EAA-xxx-G-xxxxxxxxxx-I-x-LP). Il est présent entre les hélices transmembranaires TM4 et TM5 dans certaines perméases bactériennes (Saurin *et al.*, 1994, Mourez *et al.*, 1997), dans les protéines de levure Pxa1p et Pxa2p (Shani *et al.*, 1995), dans la protéine humaine CFTR (Cotten *et al.*, 1996) et dans la première boucle cytoplasmique des protéines humaines P-gp et MRP1 (Manavalan *et al.*, 1993).

Structure des protéines ABC

Pour élucider le mécanisme par lequel la fixation et l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBD modifient les interactions entre les domaines de la protéine et permettent l'ouverture et la fermeture du canal formé par les TMD, des données structurales sont indispensables.

Jusqu'à la fin des années 90, les informations structurales sur les protéines ABC étaient très peu nombreuses. Ces dernières années, la situation a changé grâce à la détermination des structures à haute résolution d'une vingtaine de domaines NBD de protéines ABC ou de protéines apparentées impliquées dans la réparation de l'ADN ou dans la condensation du chromosome (tableau 1), ainsi que des structures complètes de 2 protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et de 4 transporteurs ABC (tableau 2). On dispose également de structures à moyenne et faible résolution pour 7 transporteurs ABC entiers (structures obtenues par différentes techniques de microscopie électronique) (tableau 2).

Tableau 1. Structures à haute résolution de domaines NBD de protéines ABC ou de protéines apparentées.

NBD	Organisme	Fonction	Résolution	Ligands	Code PDB	Référence
RbsA	<i>Escherichia coli</i>	transporteur du ribose	2,5 Å	-		Armstrong <i>et al.</i> , 1998
HisP	<i>Salmonella typhimurium</i>	transporteur de l'histidine	1,5 Å	ATP	1b0u	Hung <i>et al.</i> , 1998
MalK	<i>Thermococcus littoralis</i>	transporteur du maltose	1,9 Å	ADP	1g29	Diederichs <i>et al.</i> , 2000
MJ1267	<i>Methanococcus jannaschii</i>	transporteur d'acides aminés	2,5 Å	-	1gaj	Karpowich <i>et al.</i> , 2001
			1,6 Å	ADP-Mg ²⁺	1g6h	Karpowich <i>et al.</i> , 2001
			2,6 Å	ADP-Mg ²⁺	1g9x	Yuan <i>et al.</i> , 2003
MJ0796	<i>Methanococcus jannaschii</i>		2,7 Å	ADP-Mg ²⁺	1f3o	Yuan <i>et al.</i> , 2001
MJ0796 (E171Q)	<i>Methanococcus jannaschii</i>		1,9 Å	ATP	1l2t	Smith <i>et al.</i> , 2002
TAP1	<i>Homo sapiens</i>	transporteur d'antigènes peptidiques	2,4 Å	ADP-Mg ²⁺	1jj7	Gaudet et Wiley, 2001
HlyB	<i>Escherichia coli</i>	transporteur d'hémolysine A	2,6 Å	-	1mt0	Schmitt <i>et al.</i> , 2003
HlyB (H662A)	<i>Escherichia coli</i>	transporteur d'hémolysine A	2,5 Å	ATP-Mg ²⁺	1xef	Zaitseva <i>et al.</i> , 2005
GlcV	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	transporteur du glucose	1,65 Å	-	1oxs	Verdon <i>et al.</i> , 2003a
			2,1 Å	-	1oxt	
			2,1 Å	ADP-Mg ²⁺	1oxu	
			1,95 Å	AMP-PNP-Mg ²⁺	1oxv	
GlcV (G144A)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	transporteur du glucose	1,45 Å	-	1oxx	Verdon <i>et al.</i> , 2003b
MalK	<i>Escherichia coli</i>	transporteur du maltose	2,8 Å	-	1q1b	Chen <i>et al.</i> , 2003
			2,9 Å	-	1q1e	
			2,6 Å	ATP	1q12	
CFTR	<i>Mus musculus</i>	canal chlore	2,2 Å	-	1r0w	Lewis <i>et al.</i> , 2004
			2,2 Å	ATP-Mg ²⁺	1r0x	
			3 Å	ATP-Mg ²⁺	1r10	
			2,55 Å	ADP	1r0y	
			2,5 Å	AMP-PNP-Mg ²⁺	1q3h	
			2,35 Å	ATP-Mg ²⁺	1r0z	
CFTR-P						
CFTR (F508S)	<i>Mus musculus</i>	canal chlore	2,7 Å	ATP-Mg ²⁺	1xf9	Thibodeau <i>et al.</i> , 2005
CFTR (F508R)	<i>Mus musculus</i>	canal chlore	3,1 Å	ATP-Mg ²⁺	1xfa	Thibodeau <i>et al.</i> , 2005
CFTR (7a-ΔF508)	<i>Homo sapiens</i>	canal chlore	2,3 Å	ATP-Mg ²⁺	1xmj	Lewis <i>et al.</i> , 2005

CFTR (2b-F508A)	<i>Homo sapiens</i>	canal chlore	2,25 Å	ATP-Mg ²⁺	1xmi	Lewis <i>et al.</i> , 2005
PH0022	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	transporteur de sucres	2,2 Å 2,9 Å	- ATP	1v43 1vci	Ose <i>et al.</i> , 2004
CysA	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	transporteur du sulfate	2 Å	-	1z47	Scheffel <i>et al.</i> , 2005
RLI (ΔFeS)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	biogenèse du ribosome	1,9 Å	ADP-Mg ²⁺	1yqt	Karcher <i>et al.</i> , 2005
SufC	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	assemblage du cluster Fe-S	1,7 Å 1,9 Å	- ADP-Mg ²⁺	2d2e 2d2f	Watanabe <i>et al.</i> , 2005
TM1139	<i>Thermotoga maritima</i>	transporteur de fonction inconnue	2 Å	ATP	1ji0	Zhang <i>et al.</i> , to be Published
LmrA	<i>Lactococcus lactis</i>	transporteur de produits toxiques	3,1 Å	ATP-Mg ²⁺ et ADP-Mg ²⁺	1mv5	Yuan <i>et al.</i> , to be published
PF0895	<i>Pyrococcus furiosus</i> dsm 3638	transporteur de fonction inconnue	1,7 Å	-	1sgw	Liu <i>et al.</i> , to be published
TM0544	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	transporteur de fonction inconnue	2,1 Å	-	1vpl	Joint Center for Structural Genomics, to be published
Rad50 (Rad50cd)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	réparation de l'ADN double brin	1,6 Å 2,1 Å 1,6 Å	- AMP-PNP-Mg ²⁺ ATP	1f2t 1f2u	Hopfner <i>et al.</i> , 2000
Rad50 (Rad50-ATPase)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	réparation de l'ADN double brin	3,02 Å	-	1ii8	Hopfner <i>et al.</i> , 2001
Rad50 (Rad50cd) (S793R)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	réparation de l'ADN double brin	2,1 Å	ATPγS-Mg ²⁺	1us8	Moncalian <i>et al.</i> , 2004
SMC (SMChd)	<i>Thermotoga maritima</i>	condensation du chromosome	3,1 Å	-	1e69	Lowe <i>et al.</i> , 2001
SMC1 (SMChd)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	condensation du chromosome	2,9 Å	ATG-Mg ²⁺ et Scc1-C	1w1w	Haering <i>et al.</i> , 2004
SMC (SMCcd)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	condensation du chromosome	2 Å	-	1xew	Lammens <i>et al.</i> , 2004
SMC (SMCcd) (E1098Q)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	condensation du chromosome	2,5 Å	ATP-Mg ²⁺	1xex	Lammens <i>et al.</i> , 2004

Tableau 2. Structures à haute, moyenne ou faible résolution de protéines ABC entières ou de protéines apparentées.

Protéine	Organisme	Fonction	Résolution	Ligands	Code PDB	Référence
MsbA	<i>Escherichia coli</i>	transporteur de lipides	4,5 Å	-	1jsq	Chang et Roth, 2001
MsbA	<i>Vibrio cholera</i>	transporteur de lipides	3,8 Å	-	1pf4	Chang, 2003
MsbA	<i>Salmonella typhimurium</i>	transporteur de lipides	4,2 Å	ADP-VO ₄ ³⁻ -Mg ²⁺ et Ra LPS	1z2r	Reyes et Chang, 2005
BtuCD	<i>Escherichia coli</i>	transporteur de la vitamine B12	3,2 Å	-	1l7v	Locher <i>et al.</i> , 2002
P-gp (MDR1)	<i>Cricetulus griseus</i>	transporteur de produits toxiques	~25 Å	-		Rosenberg <i>et al.</i> , 1997
			~10 Å	-		Rosenberg <i>et al.</i> , 2001b
			~20 Å	AMP-PNP-Mg ²⁺		Rosenberg <i>et al.</i> , 2001b
			~20 Å	ADP-VO ₄ ³⁻ -Mg ²⁺		Rosenberg <i>et al.</i> , 2001b
			~20 Å	-		Rosenberg <i>et al.</i> , 2003
			~20 Å	AMP-PNP-Mg ²⁺		Rosenberg <i>et al.</i> , 2003
			~8 Å	AMP-PNP-Mg ²⁺		Rosenberg <i>et al.</i> , 2005
P-gp (Abcb1a)	<i>Mus musculus</i>	transporteur de produits toxiques	~22 Å	-		Lee <i>et al.</i> , 2002
MRP1	<i>Homo sapiens</i>	transporteur de produits toxiques	~22 Å	-		Rosenberg <i>et al.</i> , 2001a
TAP	<i>Homo sapiens</i>	transporteur d'antigènes peptidiques	~35 Å	-		Velarde <i>et al.</i> , 2001
BmrA / YvcC	<i>Bacillus subtilis</i>	transporteur de produits toxiques	~25 Å	-		Chami <i>et al.</i> , 2002
Pdr5p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	transporteur de produits toxiques	~25 Å	-		Ferreira-Pereira <i>et al.</i> , 2003
CFTR	<i>Homo sapiens</i>	canal chlore	~20 Å	AMP-PNP-Mg ²⁺		Rosenberg <i>et al.</i> , 2004
MutS	<i>Thermus aquaticus</i>	réparation de mésappariements dans l'ADN	3,19 Å	-	1ewr	Obmolova <i>et al.</i> , 2000
			2,2 Å	ADN	1ewq	Obmolova <i>et al.</i> , 2000
			2,7 Å	ADN et ADP-Mg ²⁺	1fw6	Junop <i>et al.</i> , 2001
			3,11 Å	ADN et ADP-BeF ₃	1nne	Alani <i>et al.</i> , 2003
MutS	<i>Escherichia coli</i>	réparation de mésappariements dans l'ADN	2,2 Å	ADN et ADP-Mg ²⁺	1e3m	Lamers <i>et al.</i> , 2000
			2,9 Å	ADN et ATP-Mg ²⁺	1oh5	Natrajan <i>et al.</i> , 2003
			2,9 Å	ADN et ADP-Mg ²⁺	1oh6	Natrajan <i>et al.</i> , 2003
			2,4 Å	ADN et ADP-Mg ²⁺	1oh7	Natrajan <i>et al.</i> , 2003
			2,5 Å	ADN et ADP-Mg ²⁺	1oh8	Natrajan <i>et al.</i> , 2003
			2,27 Å	ADN et ADP-Mg ²⁺	1w7a	Lamers <i>et al.</i> , 2004
Muts (R697A)	<i>Escherichia coli</i>	réparation de mésappariements dans l'ADN	2,6 Å	ADN et ADP-Mg ²⁺	1ng9	Lamers <i>et al.</i> , 2003

Structure des domaines NBD

Les domaines NBD dont les structures ont été déterminées adoptent tous la même architecture générale en forme de L (figure 4). Ils sont constitués de deux sous-domaines : le domaine α/β et le domaine α . Les protéines MalK de *Thermococcus littoralis* et d'*Escherichia coli*, GlcV de *Sulfolobus solfataricus*, PH0022 de *Pyrococcus horikoshii* et CysA d'*Alicyclobacillus acidocaldarius* contiennent également un troisième domaine C-terminal.

Le domaine α/β contient (i) le site de fixation de l'ATP, formé par des hélices α et des feuillets β . Il ressemble à celui de l'ATPase F1 et de la protéine RecA, deux ATPases qui ne font pas partie de la famille des protéines ABC et (ii) une région caractéristique des protéines ABC, formée par des brins β antiparallèles. Le domaine α/β contient le Walker A, le Walker B, la boucle H et la boucle Q.

Le domaine α est composé entièrement d'hélices α . Il est sans équivalent parmi les autres structures biologiques connus. Il contient le motif "signature ABC".

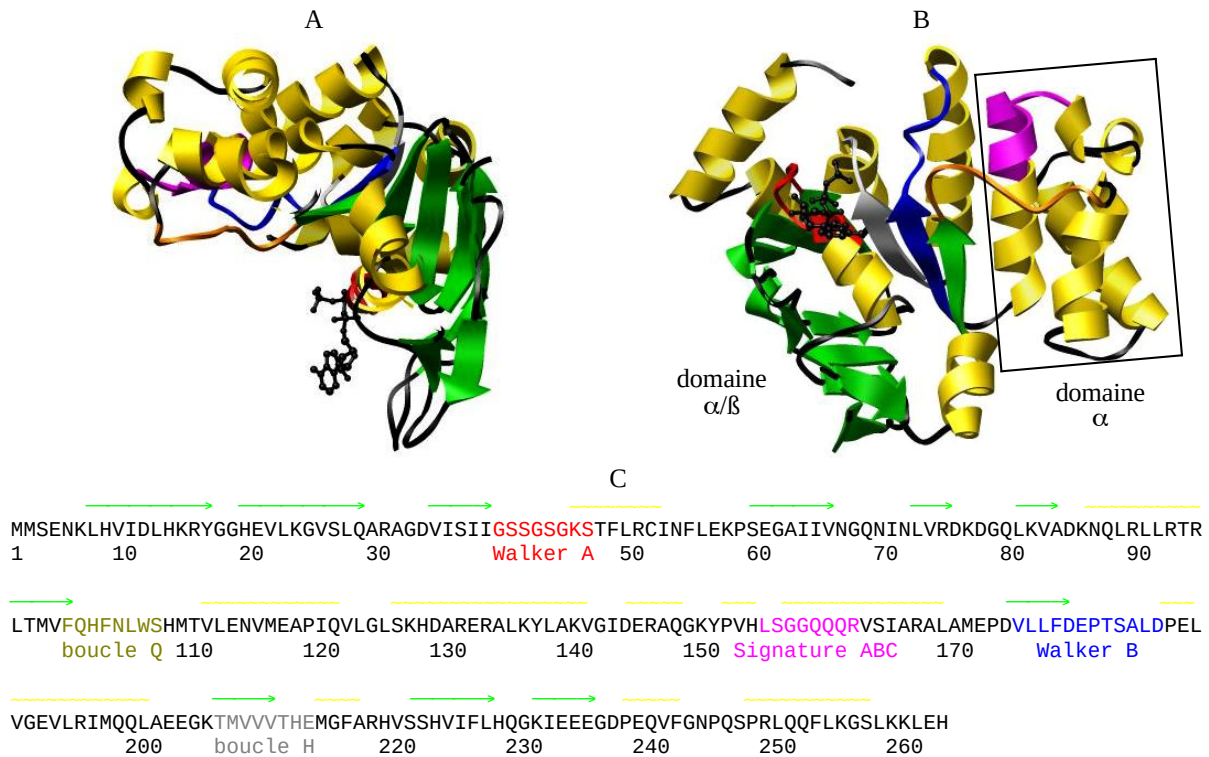


Figure 4. A. B. Structure de la protéine HisP de *Salmonella typhimurium* complexée à l'ATP (Hung *et al.*, 1998). La molécule d'ATP est en noir. Les figures ont été préparées avec le logiciel Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). C. Séquence de HisP (voir en annexe 1 les alignements des séquences des domaines NBD dont la structure a été résolue à haute résolution). Les hélices α sont en jaune et les brins β en vert. Les motifs conservés des NBD sont en rouge (Walker-A), orange (boucle Q), magenta (motif signature), bleu foncé (Walker-B) et gris (boucle H).

La première structure résolue d'un domaine NBD de protéine ABC a été celle de la protéine RbsA d'*Escherichia coli* (Armstrong *et al.*, 1998), mais la première structure publiée a été celle de la protéine HisP de *Salmonella typhimurium* (Hung *et al.*, 1998). Cette structure a été obtenue en présence d'ATP, ce qui a permis d'identifier les résidus qui interagissent avec ce nucléotide (figure 5) :

- le Walker A (GSSGSGKS) se trouve sur une boucle située entre le troisième brin β et la première hélice α . Il interagit directement avec l'ATP : la Ser-41 forme une liaison hydrogène avec un des atomes d'oxygène du phosphate γ . Les résidus Gly-42, Ser-43, Gly-44, Lys-45 et Ser-46 forment des liaisons hydrogène avec le phosphate β . La thréonine située juste après le Walker A (Thr-47) interagit avec le phosphate α .

- le Walker B (VLLFDEPTSALD) est situé à la fin du neuvième brin β . Il contient les résidus conservés Asp-178 et Glu-179, qui interagissent avec le phosphate γ via des molécules d'eau. Une de ces molécules d'eau occupe probablement la place d'un atome de magnésium (le magnésium a été omis pendant la cristallisation pour empêcher l'hydrolyse de l'ATP). L'autre est probablement la molécule d'eau catalytique.
- la glutamine (Gln-100) du motif Q, située à la fin du brin β 8, interagit aussi avec la molécule d'eau catalytique. Ainsi, on peut supposer que la Gln-100 et le Glu-179 sont des résidus activateurs de l'hydrolyse.
- l'histidine de la boucle H (His-211), localisée entre le brin β 10 et l'hélice α 7, interagit également avec le phosphate γ , via une autre molécule d'eau.

Le noyau aromatique de l'ATP n'interagit pas avec de nombreux résidus de la protéine. En fait, seulement des liaisons π - π avec la Tyr-16 ont été mises en évidence. Ceci peut expliquer pourquoi les protéines ABC peuvent hydrolyser, au moins *in vitro*, d'autres nucléotides que l'ATP.

Le domaine α (hélices α 3 à α 9) contient le motif signature (LSGGQQQR), localisé sur une boucle entre les hélices α 4 et α 5 et au début de l'hélice α 5. Une liaison hydrogène relie la Gln-158 du motif signature et l'oxygène de l'hydroxyle en position 2 du ribose. Cependant, la structure de la protéine HisP n'a pas permis de définir le rôle du motif signature. Le rôle de ce motif a été dévoilé plus tard, lorsque d'autres structures de NBD, ainsi que celles de transporteurs entiers, ont été résolues.

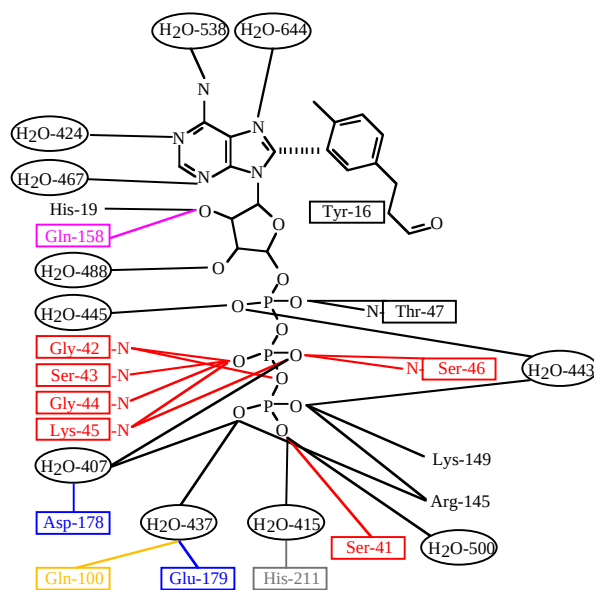


Figure 5. Schéma des interactions entre la protéine HisP et l'ATP (d'après Hung *et al.*, 1998). Les résidus appartenant aux motifs conservés des NBD sont en rouge (Walker-A), orange (boucle Q), magenta (motif signature), bleu foncé (Walker-B) et gris (boucle H).

Le mode d'interaction entre l'ATP et le Walker A, le Walker B, la boucle Q et la boucle H a été confirmé par les structures d'autres domaines NBD cristallisés en présence d'ATP ou en présence d'AMP-PNP ou d'ATP γ S, des analogues non hydrolysables de l'ATP (tableau 1).

Interactions entre les domaines NBD

Dans les cristaux de certains NBD, l'empilement des molécules suggère la formation de dimères de NBD. Trois arrangements différents ont été observés pour l'interface entre deux NBD : dos à dos (*back-to-back*), tête-tête (*head-to-head*) et tête-bêche (*head-to-tail*) (figure 6).

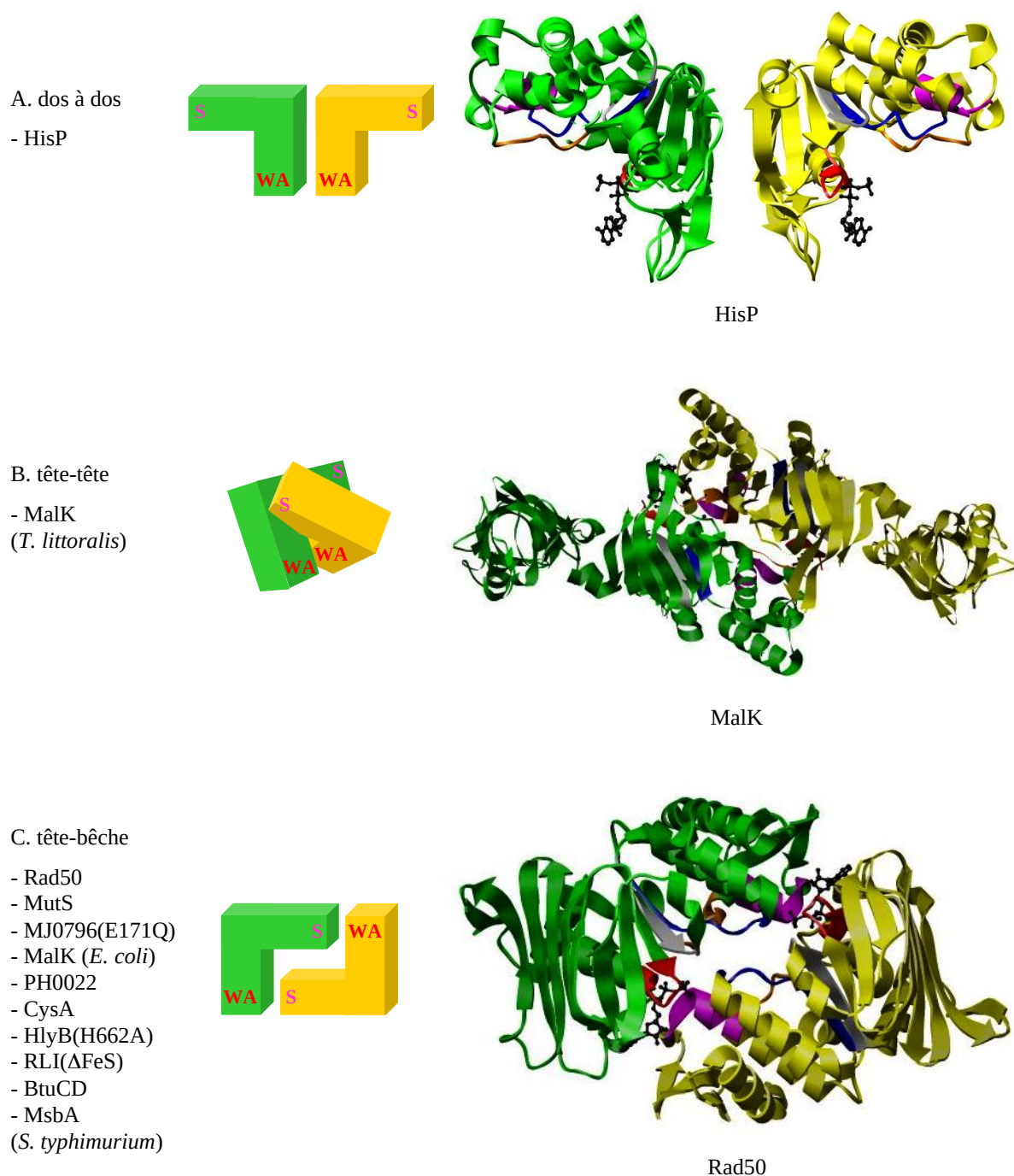


Figure 6. Représentations schématiques et exemples de structures de dimères de NBD (adapté d'après Kerr, 2002). Dans tous les cas, S désigne le motif signature et WA le motif Walker A. Les motifs conservés des NBD sont en rouge (Walker-A), orange (boucle Q), magenta (motif signature), bleu foncé (Walker-B) et gris (boucle H). La molécule d'ATP est en noir. Les figures ont été préparées avec le logiciel Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). A. Modèle dos à dos et structure du dimère HisP de *Salmonella typhimurium* (Hung *et al.*, 1998). B. Modèle tête-tête et structure du dimère MalK de *Thermococcus littoralis* (Diederichs *et al.*, 2000). C. Modèle tête-bêche et structure du dimère Rad50 (Rad50cd) de *Pyrococcus furiosus* (Hopfner *et al.*, 2000).

Le premier dimère observé a été celui formé par de la protéine HisP de *Salmonella typhimurium* (Hung *et al.*, 1998). Dans le cristal, deux protéines HisP s'associent dans une orientation dos à dos (figure 6 A). L'interface entre les sous-unités du dimère ($\sim 1000 \text{ \AA}^2$) est formée par trois brins β ($\beta 1$, $\beta 4$ et $\beta 5$) appartenant au domaine α/β . Deux résidus hydrophiles (Asp11) se retrouvent à l'interface, ce qui ne semble pas être énergétiquement favorable, car il n'y a pas de charges compensatrices. Les deux sites de liaison de l'ATP sont exposés au solvant, les deux molécules d'ATP étant à une distance de $\sim 40 \text{ \AA}$ l'une de l'autre et les deux motifs signature à plus de $80 \text{ \AA}$ l'un de l'autre. Ainsi, aucune interaction entre l'ATP et le motif signature n'est envisageable.

Les NBD du transporteur du maltose (MalK) de *Thermococcus littoralis* (Diederichs *et al.*, 2000) interagissent dans une conformation tête-tête (figure 6 B). La protéine MalK présente, du côté C-terminal, un troisième domaine régulateur. Même si on ne tient pas compte de ce domaine, la structure formée par les deux autres domaines est beaucoup plus compacte que celle du dimère HisP. L'interface est plus grande ($\sim 3000 \text{ \AA}^2$). Dans cette interface se retrouvent un certain nombre de résidus hydrophiles et aromatiques, mais il n'existe aucune liaison hydrogène entre les deux NBD. MalK a été cristallisé en présence d'ADP, mais, dans la structure, le noyau aromatique de l'ADP n'est pas visible, ce qui ne permet pas de calculer la distance internucléotidique. Par contre, la distance entre les deux motifs signature est plus petite ($\sim 18 \text{ \AA}$) que dans la structure de HisP. Les deux boucles Q interagissent à l'interface entre les deux protomères.

Dans le cas de la protéine Rad50 (Rad50cd) de *Pyrococcus furiosus* complexée soit à l'AMP-PNP- Mg^{2+} soit à l'ATP (Hopfner *et al.*, 2000), la structure de l'unité cristallographique montre le dimère dans une conformation tête-bêche (figure 6 C). Les deux sites de liaison des nucléotides se retrouvent à l'interface, face à face, et deux molécules d'ATP (ou d'AMP-PNP) établissent une liaison entre les deux domaines. En effet, chaque molécule d'ATP interagit avec les motifs Walker A et Walker B, la boucle Q et la boucle H appartenant à un domaine et avec le motif signature appartenant à l'autre domaine (figure 7). Cette conformation tête-bêche augmente la stabilité du nucléotide grâce aux interactions entre le motif signature et le noyau adénine, le ribose et le groupement triphosphate de l'ATP. Réciproquement, l'ATP stabilise l'état dimérique de la protéine. Ce positionnement, où le site de fixation de l'ATP au niveau de l'un des NBD se trouve complété par des résidus du motif signature de l'autre NBD, suggère un rôle clé du motif signature dans la fixation et /ou l'hydrolyse de l'ATP.

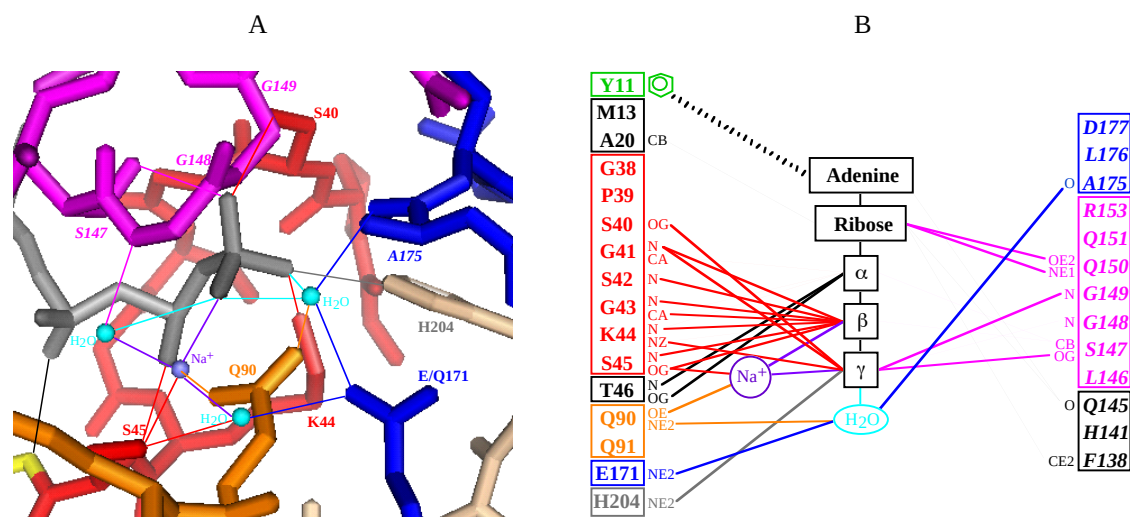


Figure 7. Interaction de la protéine MJ0796(E171Q) avec l'ATP (d'après Smith *et al.*, 2002). A. Le site actif. B. Schéma des interactions entre l'ATP, le Walker A d'un NBD et le motif signature de l'autre NBD. Les motifs conservés des NBD sont en rouge (Walker-A), orange (boucle Q), magenta (motif signature), bleu foncé (Walker-B) et gris (boucle H). La molécule d'ATP est en noir. Les liaisons d'hydrogène ($\leq 3,3$ Å) sont représentées par des lignes grasses et les interactions Van der Waals ($\leq 3,6$ Å) par les lignes fines. Les résidus appartenant au deuxième domaine NBD sont écrits en italique. La figure a été préparée avec le logiciel PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>).

Les structures obtenues ultérieurement ont permis de trancher entre ces 3 modèles. En particulier, la structure du transporteur entier BtuCD d'*Escherichia coli* (Locher *et al.*, 2002) a confirmé la pertinence du modèle fondé sur la structure de Rad50cd. L'arrangement tête-bêche a, par ailleurs, été observé dans les structures des protéines MutS de *Thermus aquaticus* (Obmolova *et al.*, 2000) et d'*Escherichia coli* (Lamers *et al.*, 2000), ainsi que dans celles des protéines MJ0796(E171Q) de *Methanococcus jannaschii* (Smith *et al.*, 2002), MalK d'*Escherichia coli* (Chen *et al.*, 2003), PH0022 de *Pyrococcus horikoshii* (Ose *et al.*, 2004), CysA d'*Alicyclobacillus acidocaldarius* (Scheffel *et al.*, 2005) et HlyB(H662A) d'*Escherichia coli* (Zaitseva *et al.*, 2005). Cet arrangement a également été retrouvé dans le transporteur entier MsbA de *Salmonella typhimurium* (Reyes et Chang, 2005) et dans la protéine RLI(Δ FeS) de *Pyrococcus furiosus* (Karcher *et al.*, 2005), qui est un hétérodimère où les deux NBD font partie d'un polypeptide unique. Cette configuration, où les résidus de chacun des deux NBD participent à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, peut expliquer pourquoi il y a toujours deux NBD dans une protéine ABC.

Structure des transporteurs ABC entiers

En 2001, la première structure à haute résolution d'un transporteur ABC entier a été résolue. Il s'agit du transporteur de lipides MsbA d'*Escherichia coli* (Chang et Roth, 2001). Par la suite, trois autres structures de protéines ABC entières ont été publiées : le transporteur de la vitamine B12 BtuCD d'*Escherichia coli* (Locher *et al.*, 2002) et les transporteurs de lipides MsbA de *Vibrio cholera* (Chang, 2003) et de *Salmonella typhimurium* (Reyes et Chang, 2005). Trois de ces structures ont été obtenues en absence de lipides, de nucléotides et de substrats. Seule la structure du transporteur de lipides MsbA de *Salmonella typhimurium* contient un substrat : le lipide Ra LPS (*rough-chemotype lipopolysaccharide*) et une molécule d'ADP-VO₄³⁻-Mg²⁺ fixée au niveau d'un des deux NBD.

Les transporteurs de lipides MsbA d'*Escherichia coli* (Chang et Roth, 2001), de *Vibrio cholera* (Chang, 2003) et de *Salmonella typhimurium* (Reyes et Chang, 2005) sont de proches homologues de la P-glycoprotéine humaine ou du transporteur LmrA de *Lactococcus lactis*. Ces protéines sont des homodimères, chaque sous-unité étant formée par un domaine NBD fusionné génétiquement à un domaine TMD. Un troisième domaine de liaison entre le NBD et le TMD a été identifié. Il est formé par des hélices α . Il est appelé "domaine intracellulaire" (ICD).

La région transmembranaire des trois protéines MsbA ci-dessus est composée de 12 hélices α (6 par monomère). Les trois structures montrent une protéine MsbA dans une conformation ouverte (MsbA d'*Escherichia coli*), plutôt fermée (MsbA de *Vibrio cholera*) ou fermée (MsbA de *Salmonella typhimurium*) (figure 8). Dans le cas de la protéine MsbA d'*Escherichia coli*, les hélices transmembranaires sont inclinées de 30 à 40° par rapport à la normale à la membrane. Les deux TMD interagissent entre eux du côté extracellulaire de la protéine et forment ainsi une structure conique, ouverte vers l'intérieur de la cellule. A l'heure actuelle, on ne sait pas si les trois structures de MsbA correspondent à des conformations natives de la protéine. En particulier, il a été suggéré que la structure de MsbA d'*Escherichia coli* pourrait avoir été induite par la cristallisation et pourrait ne pas correspondre à une conformation fonctionnelle de la protéine (Shilling *et al.*, 2003). Dans les deux autres structures de MsbA, les hélices des TMD sont davantage perpendiculaires à la membrane. Dans la structure de la protéine de *Vibrio cholera*, leur inclinaison est seulement de 10 à 30°. Les dimensions de la chambre interne de la protéine diminuent, mais cette chambre reste

ouverte vers l'intérieur de la cellule. Par contre, dans la structure de MsbA de *Salmonella typhimurium*, cette chambre s'ouvre vers l'espace périplasmique.

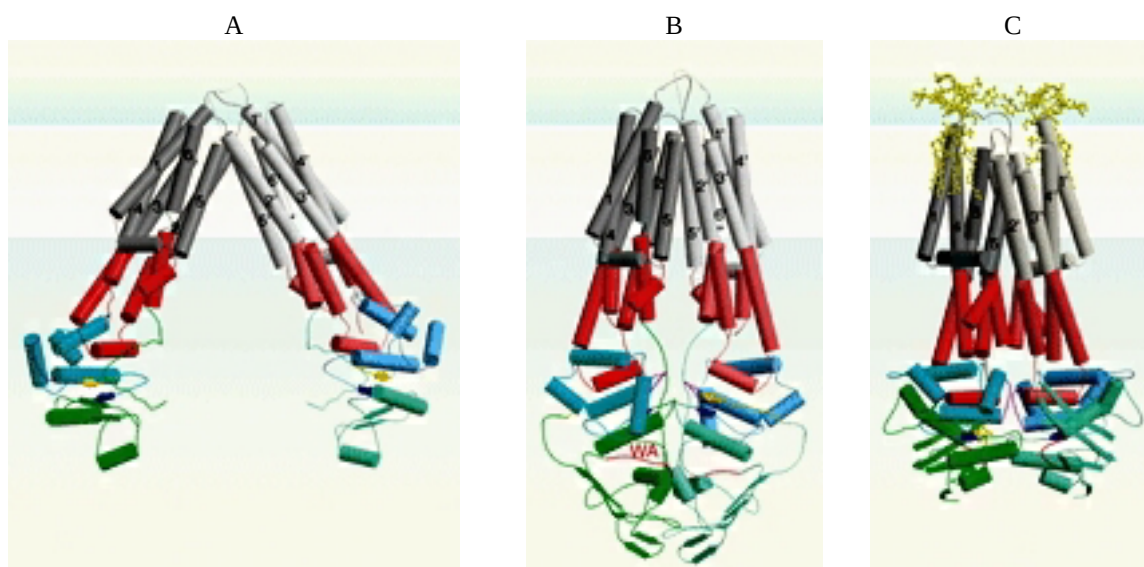


Figure 8. Structure des protéines MsbA d'*Escherichia coli* (A), de *Vibrio cholera* (B) et de *Salmonella typhimurium* (C) (d'après Davidson et Chen, 2005). Les domaines TMD sont en gris, les domaines ICD en rouge, les domaines catalytiques des NBD en vert et les domaines de signalisation des NBD en cyan. Les motifs conservés des NBD sont en rouge (Walker-A), orange (Q-Loop), magenta (motif Signature) et bleu (Walker-B). L'ADP et le Ra LPS sont en jaune.

Dans la structure de MsbA d'*Escherichia coli*, les parties N-terminales des domaines NBD sont désordonnées, mais leurs positions ont pu être prédites par homologie (Thomas et Hunt, 2001, Jones et George, 2002, Campbell *et al.*, 2003, Seigneuret et Garnier-Suillerot, 2003). Les deux NBD sont écartés de plus de 50 Å l'un de l'autre. Leurs motifs signature ne sont pas orientés vers le NBD opposé mais vers l'extérieur de la molécule (figure 9), ce qui suggère à nouveau que la structure cristalline de MsbA d'*Escherichia coli* ne correspond pas à une conformation native de la protéine (Shilling *et al.*, 2003, Jones et George, 2004, Davidson et Chen, 2004).

La structure du domaine NBD de MsbA de *Vibrio cholera* a été entièrement résolue. Mais si on la compare aux autres structures connues de NBD, on constate une rotation de $\sim 120^\circ$ des brins β antiparallèles du domaine α/β par rapport à l'axe du domaine entier. Cette rotation coupe en deux le site catalytique et déplace le motif Walker B à plus de 25 Å du Walker A. Cette configuration n'a été observée dans aucune autre structure de NBD. Elle peut représenter un état de transition ou, plus probablement, un artefact de cristallisation. Par

contre, les deux domaines NBD forment un dimère de type Rad50cd (Hopfner *et al.*, 2000). Leur orientation par rapport aux domaines TMD et ICD est très différente de celle observée dans la structure de MsbA d'*Escherichia coli*. Ils sont tournés de 180° par rapport à leur orientation dans la protéine d'*Escherichia coli* (figure 9).

Dans la structure de MsbA de *Salmonella typhimurium*, l'architecture du dimère formé par les deux domaines NBD ressemble à la conformation tête-bêche observée chez Rad50cd de *Pyrococcus furiosus* (Hopfner *et al.*, 2000). Le Walker A est situé en face du motif signature du NBD opposé, mais les deux motifs sont plus éloignés que dans les dimères d'autres protéines. Une molécule d'ADP complexée au VO_4^{3-} et au Mg^{2+} est présente dans un des deux sites de fixation du nucléotide. Elle n'interagit pas avec le motif signature de l'autre NBD.

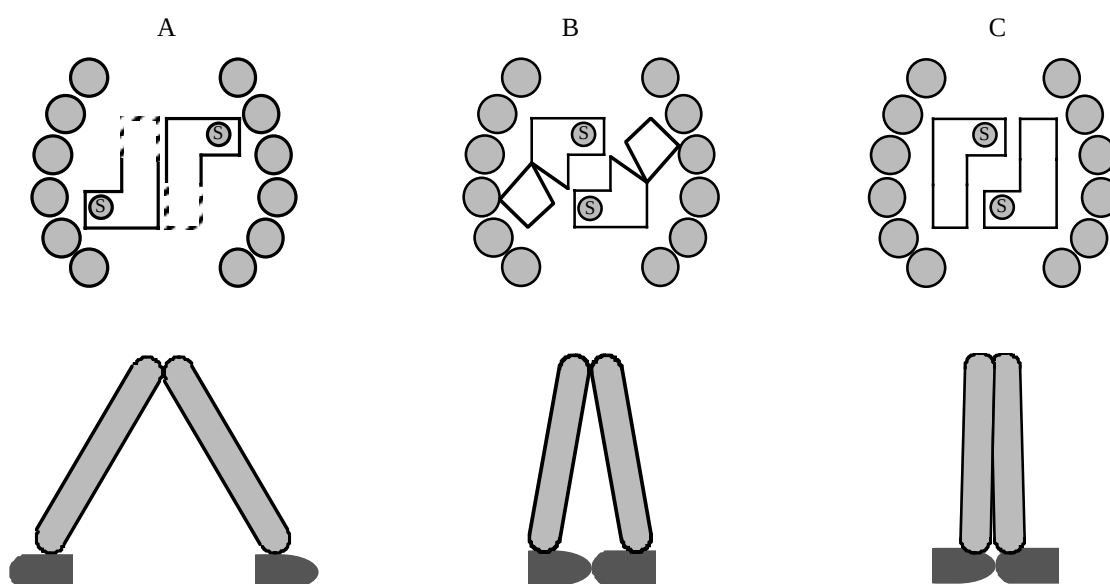


Figure 9. Représentation schématique de la structure dimérique des protéines MsbA d'*Escherichia coli* (A), de *Vibrio cholera* (B) et de *Salmonella typhimurium* (C) (adaptée d'après Jones et George, 2004). En haut, vue de dessus. Les domaines TMD sont représentés sous forme de cercles gris, les domaines NBD sous forme de "L". Dans la structure de MsbA d'*Escherichia coli* (A) la partie N-terminale est désordonnée dans le cristal et est ici représentée par des lignes pointillées. Dans la structure de MsbA de *Vibrio cholera* (B), les NBD n'ont pas une forme de "L". En bas, vue de côté. Les domaines TMD sont représentés sous forme de barres grises, les domaines NBD sous forme de rectangles arrondis du côté du motif signature.

Contrairement aux autres structures résolues, celle du transporteur de lipides MsbA de *Salmonella typhimurium* contient deux molécules de substrat (le lipide Ra LPS) du côté extracellulaire de la protéine. Chaque molécule de lipide établit de nombreuses interactions avec les hélices TM1 et TM6 d'un domaine TMD ainsi qu'avec l'hélice TM2 et la première

boucle extracellulaire (EC1) du domaine TMD opposé. Certains résidus conservés entre MsbA et P-gp se retrouvent dans ce site de fixation du lipide.

Le transporteur de la vitamine B12 BtuCD d'*Escherichia coli* (Locher *et al.*, 2002) est un hétérotétramère formé par l'assemblage de deux protéines BtuC (les domaines TMD) et de deux protéines BtuD (les domaines NBD). Il importe la vitamine B12 par l'intermédiaire de la protéine périplasmique BtuF qui lie le substrat et le présente au transporteur. La structure de BtuF a également été résolue (Borths *et al.*, 2002). L'ensemble complet est représenté sur la figure 10.

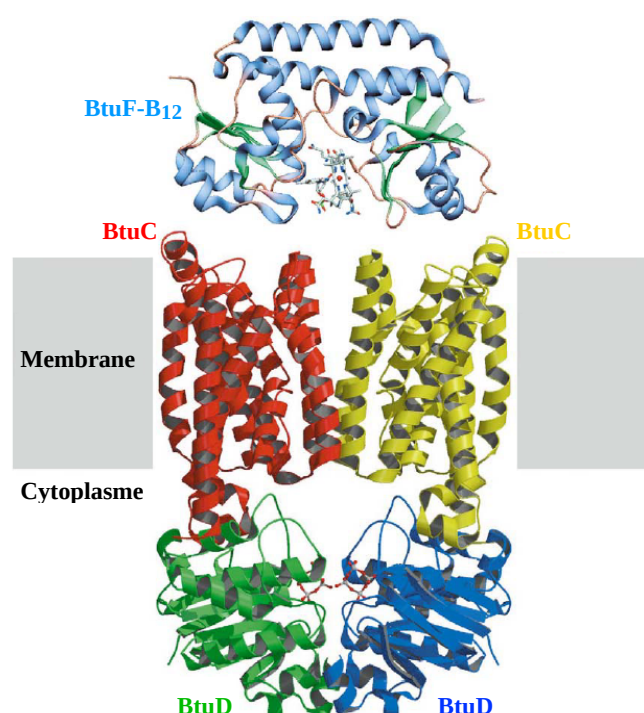


Figure 10. Structure des protéines BtuCD (Locher *et al.*, 2002) et BtuF (Borths *et al.*, 2002) d'*Escherichia coli*. BtuF est complexée à la vitamine B12 et BtuD au cyclotétravanadate. BtuF a été placée manuellement pour que les résidus glutamate conservés de BtuF s'alignent avec les résidus arginine conservés de BtuC. La molécule de vitamine B12 est ainsi placée vers l'entrée du canal formé par les deux protéines BtuC. Les deux protéines BtuC (domaines TMD) sont colorées en rouge et en jaune, les protéines BtuD (domaines NBD) en bleu foncé et en vert et la protéine BtuF en bleu clair (les hélices α) et en vert (les brins β) (d'après Locher et Borths, 2004).

La protéine BtuCD contient un grand nombre d'hélices transmembranaires (20), ce qui remet en cause l'idée qu'il existe un modèle standard de transporteur ABC avec 2x6 hélices transmembranaires. Un ensemble de 20 hélices transmembranaires a d'ailleurs été prédit également pour un autre transporteur ABC d'*Escherichia coli*, le transporteur de Fe^{3+} -hydroxamate FhuCB (Groeger et Koster, 1998). L'assemblage des hélices transmembranaires

dans la structure de BtuCD est fondamentalement différent de celui observé dans les structures des protéines MsbA. Les hélices de MsbA sont relativement bien alignées et se présentent sous forme de deux paquets, alors que celles de BtuCD forment entre elles des angles assez importants. Les deux sous-unités BtuC forment un canal qui s'ouvre vers l'espace périplasmique. Cette cavité est assez grande pour permettre le passage de la vitamine B12. Quelques résidus des boucles qui connectent les hélices du TMD ferment le canal du côté cytoplasmique. Ils forment une sorte de porte.

La structure de BtuCD diffère aussi de celles des protéines MsbA en ce qui concerne les domaines NBD. BtuD adopte l'architecture générale en forme de L déjà observée dans des NBD isolés. Les deux protomères BtuD sont disposés dans une conformation tête-bêche de type Rad50cd (Hopfner *et al.*, 2000) et les deux sites ATP sont formés à l'interface des deux molécules. Le motif signature d'un domaine se trouve à nouveau en face des motifs Walker A et Walker B et des boucles Q et H de l'autre NBD. Dans la structure de BtuCD, les deux domaines NBD sont cependant plus éloignés l'un de l'autre que dans la structure du dimère de Rad50cd (Hopfner *et al.*, 2000), ce qui pourrait s'expliquer par l'absence de nucléotide dans la structure de BtuCD. Les deux domaines sont vraisemblablement positionnés et maintenus sous forme dimérique par les interactions entre les deux domaines TMD et par les interactions entre les TMD et les NBD.

Une autre différence notable entre les structures des protéines MsbA et celle de BtuCD est que, dans BtuCD, aucun ICD n'a été identifié, les NBD étant en contact direct avec les TMD (figure 11). BtuC interagit avec BtuD via une boucle cytoplasmique située entre les hélices transmembranaires TM6 et TM7 et formée par deux petites hélices α coudées en "L" (c'est pourquoi cette boucle a été nommée "boucle L"). Elle contient le motif "EAA" conservé dans les domaines transmembranaires de certaines protéines ABC. Au niveau de BtuD, cette boucle de BtuC interagit avec des résidus qui entourent la glutamine (Q80) de la boucle Q. Ainsi, des éléments impliqués dans la liaison de l'ATP au niveau des NBD se retrouvent en contact avec les domaines transmembranaires. On peut supposer qu'ils ont un rôle dans la transmission de changements conformationnels du NBD au TMD et vice-versa. Cependant, la conservation assez faible des résidus de la boucle L, ainsi que la localisation variable de cette boucle dans les protéines où elle est présente, suggèrent que les détails de l'interaction entre TMD et NBD peuvent varier considérablement d'une protéine ABC à une autre.

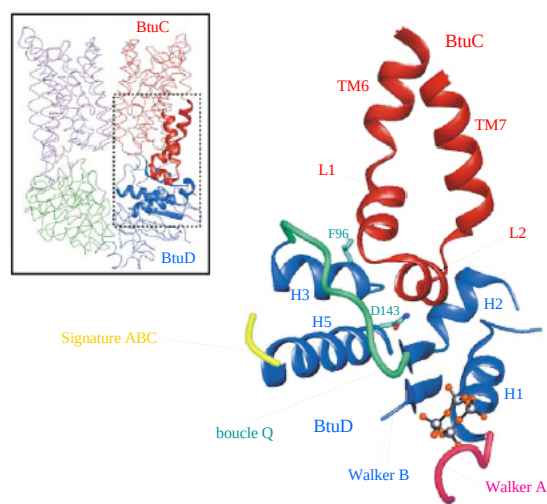


Figure 11. Vue détaillée de l'interaction entre la boucle L de BtuC et les résidus qui entourent la boucle Q de BtuD. Dans l'encadré : position de la boucle L dans la structure de BtuCD (d'après Locher et Borths, 2004).

En plus de ces quatre structures, on dispose actuellement des structures à moyenne ou faible résolution de sept autres transporteurs entiers : la P-glycoprotéine de hamster et de souris, les protéines humaines MRP1, TAP, CFTR, la protéine BmrA /YvcC de *Bacillus subtilis* et la protéine Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* (tableau 2). Ces structures ont été obtenues par des expériences de microscopie ou de cryomicroscopie électronique sur des protéines solubilisées dans du détergent, sur des protéines reconstituées dans des protéoliposomes ou sur des cristaux 2-D de la protéine.

En 1997, Rosenberg *et al.* ont ainsi publié la structure de la P-glycoprotéine (P-gp) de hamster à une résolution de ~ 25 Å (Rosenberg *et al.*, 1997). Cette structure a été obtenue par microscopie électronique de la protéine purifiée et solubilisée dans le détergent *n*-dodécyl- β -D-maltoside ou avec la protéine reconstituée dans des protéoliposomes. Dans son ensemble, la P-glycoprotéine se présente sous forme d'un cylindre ayant un diamètre de ~ 100 Å et une longueur de ~ 80 Å (figure 12). Etant donné que la membrane lipidique a une épaisseur de ~ 40 Å, seule la moitié de la protéine se trouve dans la membrane. Dans la membrane, les TMD forment une cavité fermée du côté cytoplasmique et ouverte vers l'extérieur de la cellule. Une ouverture supplémentaire de cette cavité a été observée au milieu de la membrane lipidique. Du côté intracellulaire, la P-glycoprotéine présente deux lobes de ~ 30 Å de diamètre qui correspondent très probablement aux deux domaines NBD.

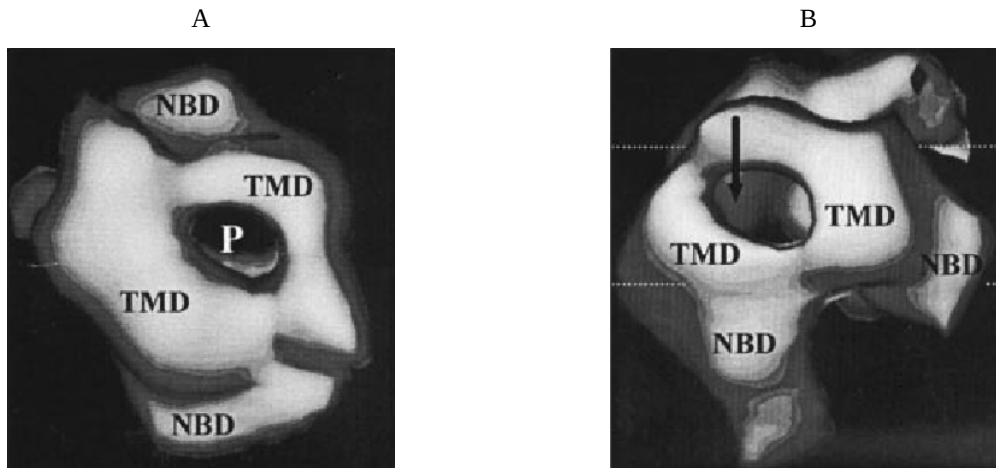


Figure 12. Structure de la P-glycoprotéine de hamster à une résolution de ~ 25 Å (d'après Rosenberg *et al.*, 1997). A. vue selon une direction perpendiculaire à la membrane lipidique du côté extracellulaire (P, pore aqueux ouvert vers l'extérieur de la cellule). B. vue latérale de la protéine; la position approximative de la membrane lipidique est indiquée par des lignes en pointillés.

Ce modèle d'organisation générale a été confirmé et affiné par la suite, lorsque la structure de la même protéine a été résolue à ~ 10 Å par cryomicroscopie électronique de cristaux 2-D (Rosenberg *et al.*, 2001b) et lorsque les structures d'autres protéines ABC de mammifères ont été déterminées : P-glycoprotéine de souris à ~ 22 Å (Lee *et al.*, 2002), protéine MRP1 humaine à ~ 22 Å (Rosenberg *et al.*, 2001a), protéine TAP humaine à ~ 35 Å (hétérodimère formé par TAP1 et TAP2) (Velarde *et al.*, 2001) et protéine CFTR humaine à ~ 20 Å (Rosenberg *et al.*, 2004).

La comparaison de ces structures à faible résolution avec les structures à haute résolution des domaines NBD a montré que les deux lobes présents du côté cytoplasmique de la protéine ont des dimensions comparables avec celles des domaines NBD. La structure à haute résolution peut être facilement modélisée dans la carte de densité des deux lobes à faible résolution. De plus, dans le cas de la protéine humaine TAP (Velarde *et al.*, 2001), la disposition des deux NBD ressemble à celle qu'on observe dans le dimère de Rad50cd (Hopfner *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les domaines TMD, l'allure des structures des protéines ABC de mammifères déterminées en absence de substrats ressemble à celle de la structure de la protéine MsbA de *Vibrio cholera*. Ainsi, pour toutes ces protéines, les deux TMD ont des dimensions qui pourraient correspondre à 2x6 hélices transmembranaires (en accord avec les prédictions faites par des analyses de séquence).

En 2001, Rosenberg *et al.* (2001b) ont publié la structure de la P-glycoprotéine complexée à l'AMP-PNP-Mg²⁺ et à l'ADP-VO₄³⁻-Mg²⁺ à une résolution de ~ 20 Å. Ces structures montrent une réorganisation importante des domaines TMD dans le plan de la membrane lipidique lors de la fixation des nucléotides (figure 13). Ces changements conformationnels ont été confirmés par la structure 3-D de la P-gp, complexée ou non à l'AMP-PNP, obtenue par microscopie électronique de cristaux 2-D colorés négativement (Rosenberg *et al.*, 2003) et par la structure à ~ 8 Å obtenue par cryomicroscopie électronique de cristaux 2-D (Rosenberg *et al.*, 2005). La structure de la protéine humaine CFTR, déterminée en présence d'AMP-PNP-Mg²⁺, a confirmé également la réorganisation des domaines TMD lors de la fixation des nucléotides (Rosenberg *et al.*, 2004).

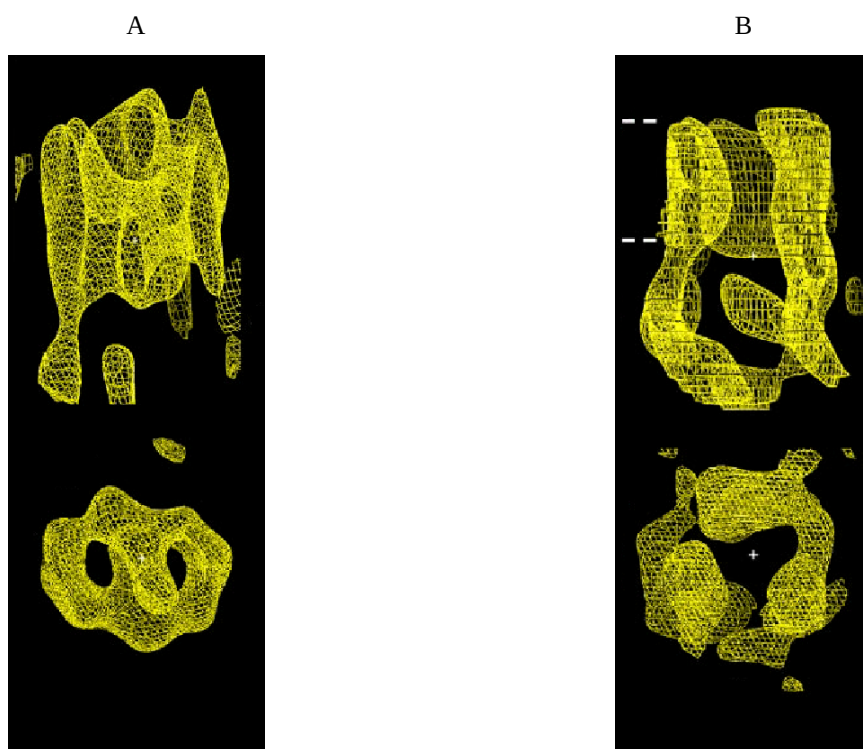


Figure 13. Structure tridimensionnelle de la P-glycoprotéine sous forme libre (A) ou complexée à l'AMP-PNP-Mg²⁺ (B). En haut, vue latérale de la protéine. En bas, vue perpendiculaire à la surface de la membrane lipidique du côté extracellulaire (d'après Rosenberg *et al.*, 2003). Les tirets blancs indiquent la position de la membrane. En comparant les deux vues perpendiculaires à la surface de la membrane lipidique, on voit que la présence d'AMP-PNP-Mg²⁺ provoque un changement de conformation des TMD.

En présence d'AMP-PNP-Mg²⁺, la P-gp n'adopte plus une forme cylindrique. La section de la protéine devient triangulaire (figure 14 C) et les 12 hélices transmembranaires se retrouvent disposées en deux blocs pseudo-symétriques correspondant aux deux domaines TMD. Quatre autres hélices ont été identifiées. Elles ne sont pas disposées d'une manière symétrique. Ce ne

sont pas des hélices transmembranaires. En ce qui concerne les domaines NBD, ils s'associent dans une orientation tête-bêche, comme dans le dimère de Rad50cd (Hopfner *et al.*, 2000).

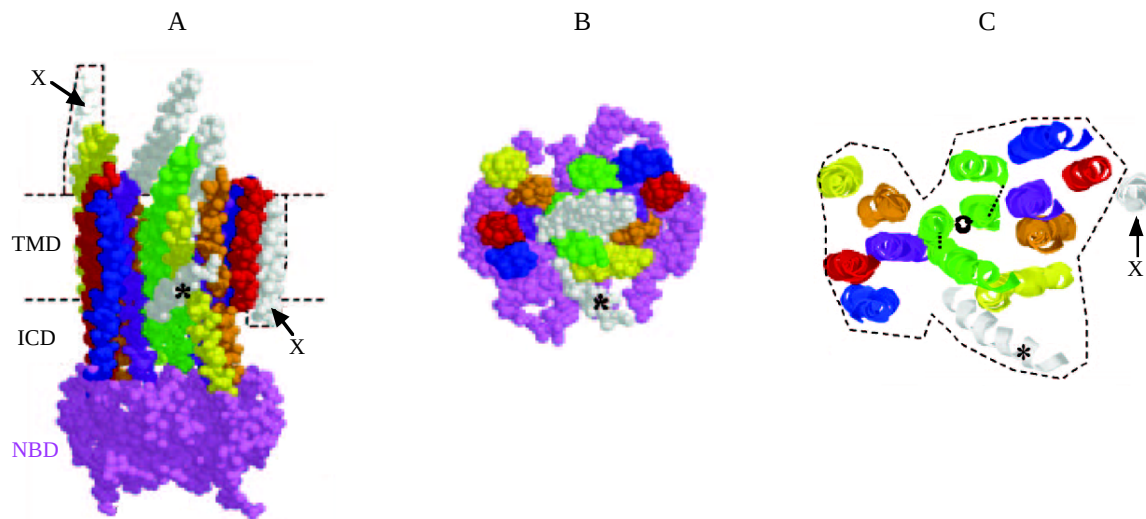


Figure 14. Structure tridimensionnelle de la P-glycoprotéine complexée à l'AMP-PNP-Mg²⁺ à une résolution de ~8 Å (d'après Rosenberg *et al.*, 2005). Les deux domaines NBD sont colorés en violet, les 6 paires d'hélices transmembranaires des domaines TMD sont colorées différemment (rouge, bleu, violet, orange, jaune, vert), 4 hélices non membranaires sont en gris. Une de ces hélices (*) se trouve du côté cytoplasmique. Elle est trop courte pour être transmembranaire. La position d'une autre hélice (X) est ambiguë. En effet, la densité électronique correspondante se trouve à l'interface entre deux molécules dans les cristaux. Comme la résolution n'est pas suffisante pour permettre le tracé complet de la chaîne polypeptidique, on ne peut pas savoir de quelle molécule provient cette densité électronique. A. vue latérale de la protéine. B. vue perpendiculaire à la surface extracellulaire de la membrane lipidique. C. vue perpendiculaire à la surface extracellulaire de la membrane lipidique. Sur cette dernière vue, les deux NBD ont été enlevés pour augmenter la clarté du schéma.

Les protéines MRP1 et CFTR présentent des domaines additionnels. Dans le cas de MRP1, on trouve un domaine N-terminal (TMD0) formé, d'après les analyses de la séquence, par 5 hélices transmembranaires, lorsque la protéine est analysée sous forme soluble par microscopie électronique. Ce domaine est visible sur la structure (Rosenberg *et al.*, 2001a). Il est situé à l'extérieur du cylindre formé par les deux domaines TMD. Le domaine régulateur R de CFTR n'est pas clairement défini sur la structure à ~20 Å actuellement disponible (Rosenberg *et al.*, 2004).

Contrairement aux autres protéines ABC de mammifères, MRP1 reconstituée dans des protéoliposomes se présente sous forme dimérique (Rosenberg *et al.* 2001a). Une organisation dimérique a aussi été observée dans le cas des protéines BmrA /YvcC de *Bacillus subtilis* (Chami *et al.*, 2002) et Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* (Ferreira-Pereira *et al.*, 2003). La

dimérisation des ces protéines pourrait être simplement due à des interactions protéine-protéine favorables créées lors de la reconstitution dans des protéoliposomes. Mais elle peut aussi correspondre à une organisation fonctionnelle. Plusieurs expériences suggèrent, en effet, que certains transporteurs ABC puissent former des dimères lorsqu'ils sont sous forme fonctionnelle dans les membranes cellulaires (Boscoboinik *et al.*, 1990, Poruchynsky et Ling, 1994, Naito et Tsuruo, 1992, Soszynski *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2000).

Les protéines BmrA /YvcC de *Bacillus subtilis* et Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* ressemblent beaucoup plus à la protéine MsbA d'*Escherichia coli* que les protéines de mammifères. Comme dans le cas de MsbA, les domaines TMD sont inclinés d'un angle de 30 à 40° par rapport à la perpendiculaire à la membrane. Ils forment aussi une structure conique ouverte vers l'intérieur de la cellule. Des différences subsistent au niveau des domaines NBD. Ils sont plus rapprochés l'un de l'autre que dans MsbA. Ils sont également asymétriques.

Les structures de transporteurs ABC entiers évoqués ci-dessus indiquent que la conformation d'un transporteur peut être profondément modifiée par la fixation d'un nucléotide. Elle ont également confirmé l'idée que la structure et l'assemblage des domaines transmembranaires (TMD) pouvaient varier beaucoup d'un transporteur à l'autre.

Mécanisme d'action des transporteurs ABC

Les données structurales ont répondu à un certain nombre de questions concernant le mécanisme d'action des transporteurs ABC. Elles ont notamment confirmé que des résidus hautement conservés étaient impliqués dans la fixation de l'ATP au niveau des domaines NBD et que les deux domaines TMD formaient un canal par lequel le substrat est transporté à travers la membrane. Mais comment l'ATP est-il hydrolysé ? Les deux domaines NBD sont-ils identiques d'un point de vue fonctionnel ? Les deux hydrolysent-ils l'ATP ? L'hydrolyse d'ATP est-elle coopérative ? Les deux NBD interagissent-ils vraiment entre eux comme cela a été observé dans les structures de Rad50cd et dans celles de plusieurs autres protéines ABC ? Comment le produit transporté (le substrat) est-il reconnu par le transporteur ? Comment l'interaction avec le substrat se trouve-t-elle transmise jusqu'aux domaines NBD ? Comment la fixation et l'hydrolyse de l'ATP gouvernent-elles l'ouverture et la fermeture du canal formé

par les TMD ? Quelle est la stœchiométrie de la consommation d'ATP dans le transport ? Le mécanisme de couplage énergétique est-il le même pour toutes les protéines ABC ?

Des nombreuses études biochimiques, réalisées aussi bien sur des importateurs procaryotes que sur des exportateurs procaryotes ou eucaryotes, permettent d'ébaucher certaines réponses à ces questions.

Les transporteurs de l'histidine (HisQMP₂) et du maltose (MalFGK₂) des bactéries à Gram négatif ont ainsi été intensivement caractérisés. La P-glycoprotéine de mammifères, son homologue bactérien LmrA, la protéine MRP1 de mammifères, le canal chlore CFTR, le récepteur aux sulfonilurées SUR1 et le couple de protéines Rad50-Mre11 ont également été très étudiés.

Le fonctionnement des domaines NBD

Les protéines ABC hydrolysent l'ATP au niveau des domaines NBD en générant de l'ADP et du phosphate inorganique (P_i). Il n'y a pas d'intermédiaire phosphorylé de l'enzyme comme c'est le cas pour les P-ATPases (Lelong *et al.*, 1994). L'orthovanadate (VO₄³⁻ ou V_i) est un analogue du P_i qui inhibe l'activité ATPasique des protéines ABC en formant un complexe ADP-VO₄³⁻-Mg²⁺. Ce complexe reste fixé de façon stable au niveau du site actif après l'hydrolyse de l'ATP.

Comme on l'a vu ci-dessus, les structures à haute résolution des domaines NBD ont permis d'identifier les résidus de ces domaines en contact avec l'ATP. L'implication de ces résidus dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, ainsi que dans la transmission des "messages" entre les NBD et les TMD, a également été soulignée par des méthodes biochimiques.

Les données structurales indiquent que les acides aminés du Walker A interagissent avec les phosphates de l'ATP, grâce en particulier à une lysine conservée (Hung *et al.*, 1998). En accord avec cette conclusion, le changement de cette lysine en arginine dans l'un ou l'autre des NBD de la P-gp de souris entraîne une perte complète de l'activité de transport de la protéine (Azzaria *et al.*, 1989). Par contre, les protéines mutantes sont toujours capables de fixer l'ATP. Dans le cas de la protéine MalK d'*Escherichia coli*, une mutation de la lysine conservée en Asn, Gln, Glu ou Ile diminue nettement l'affinité de la protéine MalFGK₂ pour l'ATP et abolit l'activité de transport de la protéine (Panagiotidis *et al.*, 1993). Des résultats soulignant l'importance fonctionnelle de cette lysine ont également été obtenus avec d'autres

protéines ABC, comme, par exemple, la protéine HlyB de *Escherichia coli* (Koronakis *et al.*, 1995), le transporteur de l'histidine de *Salmonella typhimurium* (Shyamala *et al.*, 1991) ou la protéine Ste6p de *Saccharomyces cerevisiae* (Berkower et Michaelis, 1991).

Les acides aminés du Walker B interviennent également dans la fixation de l'ATP. Le résidu Asp conservé interagit ainsi avec le contre-ion Mg^{2+} de l'ATP (Mimura *et al.*, 1991, Yuan *et al.*, 2001, Verdon *et al.*, 2003a, Karpowich *et al.*, 2001). Comme le montrent des expériences sur les protéines MalK d'*Escherichia coli*, HisP de *Salmonella typhimurium* et HlyB de *Escherichia coli*, la mutation de cet Asp abolit la capacité du domaine NBD à fixer et hydrolyser l'ATP (Panagiotidis *et al.*, 1993, Shyamala *et al.*, 1991, Koronakis *et al.*, 1995). Les structures de HisP d'*Escherichia coli* (Hung *et al.*, 1998), MJ0796 de *Methanococcus jannaschii* (Yuan *et al.*, 2001) ou GlcV de *Sulfolobus solfataricus* (Verdon *et al.*, 2003a) montrent que le résidu Glu qui suit immédiatement cet Asp interagit avec le phosphate γ via une molécule d'eau et que cette molécule d'eau est bien placée pour attaquer la liaison du γ -phosphate à l'ATP. Cette observation, ainsi que la comparaison avec les données disponibles sur l'ATPase F1 et sur la protéine RecA, ont conduit à proposer un rôle catalytique pour ce résidu Glu (Yoshida et Amano, 1995, Hung *et al.*, 1998, Geourjon *et al.*, 2001, Orelle *et al.*, 2003). Sa mutation n'inhibe pas la fixation de l'ATP (Smith *et al.*, 2002, Carrier *et al.*, 2003), mais elle réduit considérablement l'activité ATPasique (Shyamala *et al.*, 1991, Bliss *et al.*, 1996, Orelle *et al.*, 2003). Le rôle de ce Glu comme base catalytique est cependant remis en question par des expériences récentes sur la protéine HlyB d'*Escherichia coli*, qui montrent notamment que l'activité ATPasique est la même en présence d' H_2O ou de D_2O (Zaitseva *et al.*, 2005). Or, si l'étape limitante de la réaction correspondait à une catalyse par une base généralisée, on aurait obtenu une vitesse plus faible en présence de D_2O . En fait, il se pourrait que le Glu suivant l'Asp conservé du Walker B n'exerce pas de rôle catalytique, mais soit impliqué dans la dimérisation des NBD (Tomblin *et al.*, 2004) ou serve à positionner correctement l'histidine de la boucle H qui, elle, aurait un rôle catalytique (voir ci-dessous) (Zaitseva *et al.*, 2005).

Le motif signature ABC est spécifique des protéines ABC. Il semble impliqué à la fois dans la transmission de changements conformationnels du NBD au TMD (Hyde *et al.*, 1990, Schmees *et al.*, 1999) et dans l'hydrolyse de l'ATP (Hoof *et al.*, 1994, Koronakis *et al.*, 1995, Bakos *et al.*, 1997, Schmees *et al.*, 1999). Le motif signature peut être vu aussi comme une "sonde du phosphate γ ", car les deux résidus les plus conservés (la serine en position 2, et la glycine en position 4) interagissent avec ce phosphate (figure 7). De plus, il semble

maintenant clair que le motif signature du NBD opposé puisse venir compléter le site de liaison de l'ATP, ce qui suggère que l'ATP induise la dimérisation des NBD. Cette dimérisation n'a pas pu être facilement mise en évidence par des méthodes biochimiques. En effet, les domaines NBD isolés en solution ont tendance à rester sous forme monomérique aussi bien en absence qu'en présence d'ATP (Nikaido *et al.*, 1997, Schneider *et al.*, 1994, Greller *et al.*, 1999, Verdon *et al.*, 2003b). Cependant, dans certains cas, comme, par exemple, celui de Rad50cd, une dimérisation des NBD en solution en présence d'ATP (ou de son analogue non hydrolysable AMP-PNP) a été effectivement démontrée (Hopfner *et al.*, 2000). Une dimérisation a été également observée dans le cas de HlyB, après un photomarquage avec le 8-azido-ATP (Benabdelhak *et al.*, 2005), ou dans le cas de MalK, en présence des domaines TMD du transporteur entier, les protéines MalF et MalG (Hunke *et al.*, 2000). Cette dimérisation semble se produire plus facilement dans le cas de NBD déficients pour l'hydrolyse de l'ATP, mais toujours capables de fixer ce nucléotide. Ainsi, dans les protéines MJ0796, MJ1267 ou GlcV, une mutation de la Glu suivant immédiatement l'Asp conservé du Walker B conduit à la formation de dimères suffisamment stables pour qu'il restent associés pendant une chromatographie d'exclusion (Smith *et al.*, 2002, Moody *et al.*, 2002, Verdon *et al.*, 2003b). La proximité des motifs signature et Walker A a également été mise en évidence par des expériences de *cross-linking* (Loo *et al.*, 2002) ou de photoclivage en présence de vanadate et d'ATP (Fetsch et Davidson, 2002).

La Gln de la boucle Q interagit avec le contre-ion Mg^{2+} de l'ATP et avec une molécule d'eau. Cette Gln se trouve sur une boucle de connexion entre le domaine α/β et le domaine α . Les structures de la protéine HisP complexée à l'ATP (Hung *et al.*, 1998) et de la protéine MJ1267 complexée à l'ADP (Karpowich *et al.*, 2001) ont été comparées. Cette comparaison a mis en évidence que l'hydrolyse de l'ATP était accompagnée d'un mouvement de rotation de $\sim 15^\circ$ du domaine α/β par rapport au domaine α et d'un déplacement important de la glutamine ci-dessus (Q100 dans HisP et Q89 dans MJ1267). En effet, dans la structure de HisP, cette glutamine se retrouve à $\sim 5 \text{ \AA}$ du phosphate γ de l'ATP et interagit avec celui-ci via une molécule d'eau. Dans la structure de MJ1267, la glutamine est éloignée de plus de $12 \text{ \AA}$ du site actif. Ce déplacement pourrait être le premier signal envoyé aux autres domaines du transporteur à la suite de l'hydrolyse de l'ATP. Des changements conformationnels similaires ont été proposés par Smith *et al.* (2002), à partir de l'analyse de la protéine MJ0796 de *Methanococcus jannaschii* complexée à l'ADP (Yuan *et al.*, 2001) et d'un mutant inactif de celle-ci complexé à l'ATP- Na^+ (Smith *et al.*, 2002). Les acides aminés de la boucle Q seraient

donc directement impliqués dans la transmission des changements conformationnels du NBD au TMD et vice-versa (revue par Schneider et Hunke, 1998). Cette idée a été confirmée par la structure du transporteur BtuCD (figure 11) (Locher *et al.*, 2002) et par le fait que la mutation de ces acides aminés n'influence pas significativement l'hydrolyse de l'ATP, mais affecte l'activité de transport de la protéine entière (Shyamala *et al.*, 1991, Walter *et al.*, 1992).

L'histidine de la boucle H interagit également avec le phosphate γ via une autre molécule d'eau. Elle pourrait jouer un rôle dans la transmission de changements conformationnels du NBD au TMD lors de la fixation de l'ATP (Geourjon *et al.*, 2001). Mais cette histidine semble aussi impliquée dans l'hydrolyse de l'ATP. En effet, sa mutation réduit de façon significative la vitesse d'hydrolyse de l'ATP, bien que les protéines mutantes conservent la capacité de fixation de l'ATP (Shyamala *et al.*, 1991, Davidson et Sharma, 1997, Nikaido et Ames, 1999, Zaitseva *et al.*, 2005). Comme décrit plus haut, les résultats sur le Glu "catalytique" semblent contradictoires. Sur la base du dimère HlyB(H662A) d'*Escherichia coli* complexé à l'ATP-Mg²⁺, Zaitseva *et al.* proposent que cette histidine puisse être la base catalytique (Zaitseva *et al.*, 2005).

Les structures des domaines NBD ont également mis en évidence le rôle d'un acide aminé aromatique interagissant par des liaisons π - π avec le noyau adénine de l'ATP. L'importance de cet acide aminé dans la stabilisation du complexe avec l'ATP a été confirmée par des méthodes biochimiques. Sa substitution par un acide aminé polaire abolit la capacité du domaine NBD à fixer l'ATP (Shyamala *et al.*, 1991, Zhao et Chang, 2004).

En conclusion, les données biochimiques et structurales n'ont pas encore permis d'élucider complètement le mécanisme moléculaire d'hydrolyse de l'ATP, mais elles permettent d'avancer un modèle dans lequel le site catalytique serait formé par le Walker A, le Walker B et les boucles Q et H d'un NBD et le motif signature de l'autre NBD. La dimérisation des deux NBD serait favorisée par la fixation de l'ATP, qui induirait une rotation du domaine α par rapport au domaine α/β (Hopfner *et al.*, 2000) et provoquerait une réorganisation des motifs conservés autour de la molécule d'ATP.

Le rôle des domaines TMD

Les deux domaines TMD forment un canal par lequel le substrat est transloqué à travers la membrane.

Certaines protéines ABC transportent un seul substrat ou une seule classe de substrats, alors que d'autres reconnaissent une multitude de substrats, très différents par leur structure, leur dimension ou leur charge. Au moins dans certains cas, la spécificité de substrat semble déterminée par un ou plusieurs sites localisés au niveau des domaines TMD. Ainsi, des études de mutants de délétion de la P-glycoprotéine humaine indiquent que les domaines TMD seuls sont capables de lier les substrats (Loo et Clarke, 1999b). Ces sites sont formés par les hélices transmembranaires. Ils impliquent aussi, parfois, les boucles qui font la liaison entre ces hélices transmembranaires (Jones et George, 2004). Certaines protéines ont un seul site de liaison des substrats (ex. TAP), tandis que d'autres semblent en avoir plusieurs (ex. P-gp).

La localisation de ces sites a été réalisée principalement en utilisant des analogues photoactivables de substrats, ou des analogues portant des groupements capables de se lier covalamment aux résidus cystéine du transporteur.

Ces sites de fixation des substrats sont plus ou moins spécifiques. Par exemple, le transporteur de peptides TAP a un seul site de fixation des peptides, formé à parts égales par les TMD de TAP1 et de TAP2 (Nijenhuis et Hammerling, 1996). Apparemment, TAP a une faible sélectivité pour ses substrats. Cette protéine transporte des peptides dont la longueur peut être comprise entre 8 à 40 acides aminés (Koopmann *et al.*, 1996). Le criblage d'une banque de peptides a montré qu'une certaine spécificité s'exerçait au niveau des 3 premiers acides aminés du côté N-terminal du peptide (Lys, Asn ou Arg en position 1, Arg en position 2 et Trp ou Tyr en position 3) et au niveau du dernier acide aminé (un résidu hydrophobe ou basique (Phe, Leu, Tyr ou Arg)) (Uebel *et al.*, 1997).

Dans le cas de la P-glycoprotéine, des études pharmacologiques ont conduit à la conclusion que cette protéine possédait plusieurs sites de liaison des substrats : la P-gp est capable de fixer plusieurs ligands à la fois, d'une manière qui peut impliquer une coopérativité positive ou négative (Martin *et al.*, 1997, 2000a, Dey *et al.*, 1997, Shapiro et Ling, 1997, Shapiro *et al.*, 1999, Garrigues *et al.*, 2002b, Maki *et al.*, 2003, Loo *et al.*, 2003b,c). Ces sites sont de deux types : des sites depuis lesquels les ligands peuvent être transportés et des sites qui ont des rôles allostériques. En absence de données structurales à haute résolution, il n'est pas possible de préciser si les sites de la P-gp appartiennent à une seule grande poche dont

certaines régions auraient une spécificité plus grande pour tel ou tel substrat, ou si ces sites sont individualisés et situés dans différentes régions de la protéine. Néanmoins, la première hypothèse semble privilégiée. En effet, Loo et Clarke ont "cartographié" cette poche de fixation des substrats en utilisant des réactifs bifonctionnels (Loo et Clarke, 2001c). Ils ont trouvé qu'elle ressemblait à un "entonnoir" rétréci vers l'intérieur de la cellule et élargi du côté externe, en accord avec la structure à faible résolution de la P-gp montrant la présence d'un pore d'un diamètre de ~ 50 Å du côté extracellulaire (Rosenberg *et al.*, 1997, 2001b, 2003). Cette poche est aqueuse (Loo *et al.*, 2004) et formée par des résidus appartenant à de nombreuses hélices transmembranaires des deux domaines TMD (Loo et Clarke, 1997, 1999a, 2000, 2001b, 2002a). Les sites de fixation des substrats de la P-gp ne sont pas très spécifiques. Ces sites ne reconnaissent pas de motifs chimiques précis, mais sont plutôt sensibles à la forme, à la taille ou à la distribution des éléments hydrophobes ou hydrophiles présentés par les substrats (Garrigues *et al.*, 2002b). Les substrats de la P-gp sont des molécules plutôt hydrophobes. Il a été postulé que le transporteur P-gp fonctionne comme un "aspirateur" (Gottesman et Pastan, 1993). Les substrats entreraient dans la bicouche lipidique par diffusion. De là, ils seraient extraits par la P-gp, hydratés dans la poche de fixation (Loo *et al.*, 2004) et enfin transportés vers l'extérieur de la cellule. Récemment, Loo et Clarke ont émis l'hypothèse selon laquelle les substrats passeraient par des "portes" ouvertes entre les hélices transmembranaires pour accéder à leur site de fixation (Loo et Clarke, 2005).

Quelles que soient les modalités d'interaction avec le substrat, pendant un cycle catalytique, les deux TMD doivent lier ce substrat d'un côté de la membrane et le libérer de l'autre côté. Cela implique une réorganisation des hélices transmembranaires, ainsi qu'une diminution de l'affinité du transporteur pour le substrat (passage d'un site à haute affinité à un site à faible affinité).

Un cas particulier est constitué par les importateurs bactériens qui sont dépendants d'une protéine localisée à l'extérieur du cytoplasme. Cette protéine (PBP, *periplasmic binding protein*) lie le substrat et le présente au transporteur. Elle a une grande spécificité et une grande affinité pour son substrat. Elle lie une seule molécule de substrat. Cette liaison s'accompagne de changements conformationnels permettant à la protéine d'interagir ensuite avec les extrémités extracellulaires des domaines TMD du transporteur (Sharff *et al.*, 1992, Binnie *et al.*, 1992). Dans le cas du transporteur de la vitamine B12, les données structurales indiquent qu'une seule protéine PBP (BtuF) interagit avec le transporteur BtuCD, la stœchiométrie du complexe étant donc BtuC₂D₂F (Borths *et al.*, 2002). Cependant, dans

certaines transporteurs bactériens une protéine PBP est fusionnée génétiquement à chaque domaine TMD, ce qui suggère que ces protéines ont deux sites de fixation du substrat (ex. le transporteur de la bétaine OpuA /BusA de *Lactococcus lactis* (Obis *et al.*, 1999, van der Heide et Poolman, 2000)). La spécificité de substrat de ces importateurs n'est cependant pas entièrement contrôlée par de la protéine PBP. Des données génétiques indiquent que les TMD jouent aussi un rôle dans la reconnaissance de la molécule libérée par la PBP (Shuman, 1982, Speiser et Ames, 1991), même s'ils ne possèdent pas de site de liaison extrêmement spécifique (Locher *et al.*, 2002).

Mécanisme de couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et le transport des substrats par les protéines ABC

En hydrolysant l'ATP, les domaines NBD fournissent l'énergie nécessaire au transport du substrat. Pendant un cycle catalytique, les NBD et les TMD doivent donc s'influencer réciproquement. La fixation et /ou l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBD modifie l'affinité des TMD pour leur substrat, et la liaison du substrat au niveau des TMD agit sur la capacité des NBD à fixer et /ou hydrolyser l'ATP.

Les structures à haute résolution des protéines MsbA et BtuCD ont mis en évidence deux types d'interaction entre les TMD et les NBD : interaction directe (BtuCD) ou via des domaines ICD (MsbA) (voir *Structure des transporteurs ABC entiers*).

Par ailleurs, les méthodes spectroscopiques, d'accessibilité de produit chimiques ou de protéolyse ont mis en évidence des changements conformationnels au niveau des NBD induits par la fixation du substrat au niveau des TMD (Liu et Sharom, 1996, Sonveaux *et al.*, 1999, Kreimer *et al.*, 2000, Mannering *et al.*, 2001, Neumann *et al.*, 2002, Manciu *et al.*, 2003). Dans des nombreux cas, il a été montré que les substrats stimulaient l'activité ATPasique des protéines ABC (Mimmack *et al.*, 1989, Bishop *et al.*, 1989, Ambudkar *et al.*, 1999). Cette stimulation pourrait être due à une augmentation de l'affinité des NBD pour l'ATP (Gao *et al.*, 2000, Qu *et al.*, 2003) et /ou à une influence directe sur la vitesse d'hydrolyse (Senior *et al.*, 1995). De plus, Loo *et al.* ont démontré que les substrats qui stimulent l'activité ATPasique de la P-gp agissent en favorisant la dimérisation des NBD, alors que des composés inhibiteurs ont un effet contraire (Loo *et al.*, 2003a).

Par ailleurs, la fixation et /ou l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBD modifie l'arrangement des hélices transmembranaires des domaines TMD (Sonveaux *et al.*, 1999, Kreimer *et al.*, 2000, Vigano *et al.*, 2000, Loo et Clarke, 2001a, 2002b, Manciu *et al.*, 2003, Rosenberg *et al.*, 2001b, 2003, 2004, 2005), ce qui entraîne une baisse de l'affinité pour le substrat (Ramachandra *et al.*, 1998, Sauna et Ambudkar, 2000, 2001, Rosenberg *et al.*, 2001b, Martin *et al.*, 2000b, 2001, Payen *et al.*, 2003) et pourrait faciliter son relargage de l'autre côté de la membrane.

Les premières études biochimiques de la P-glycoprotéine (P-gp) ont conduit Alan Senior à proposer le "modèle d'hydrolyse alternative de l'ATP au niveau des deux NBD" (Senior *et al.*, 1995). Dans ce modèle, schématisé dans la figure 15, il est postulé que l'ATP se lie d'abord au niveau d'un des deux NBD sans pouvoir être hydrolysé. Par ailleurs, une molécule de substrat se fixe sur un site à haute affinité situé du côté intracellulaire. Ensuite, la liaison d'une autre molécule d'ATP au niveau de l'autre NBD entraîne l'hydrolyse de l'ATP au niveau du premier NBD. Ce NBD passe ainsi dans un état à haut potentiel chimique. Sa relaxation fournit l'énergie pour le transport de la molécule de substrat. Le substrat passe ainsi du site à haute affinité situé du côté intracellulaire à un site à faible affinité situé du côté extracellulaire. Dans le cycle suivant, l'hydrolyse de la molécule d'ATP fixée au niveau du second NBD va fournir l'énergie pour le transport d'une autre molécule de substrat.

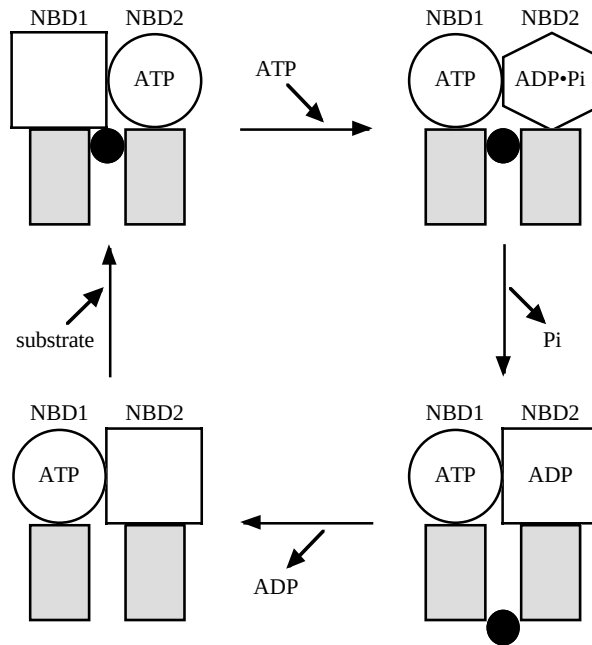


Figure 15. Le "modèle d'hydrolyse alternative de l'ATP au niveau des deux NBD" (Senior *et al.*, 1995). Les deux domaines NBD dans différents états sont représentés sous forme de cercles, d'hexagones ou de carrés blancs, les deux domaines TMD sous forme de rectangles gris et la molécule de substrat sous forme d'un cercle noir. En haut, à gauche : le NBD1 est vide (carré blanc), au niveau du NBD2 une molécule d'ATP est fixée (cercle blanc), le substrat est lié dans le site de haute affinité situé du côté intracellulaire. En haut, à droite : la fixation d'un deuxième ATP au niveau du NBD1 (cercle blanc) permet l'hydrolyse de la molécule d'ATP au niveau du NBD2 (hexagone blanc). L'hydrolyse de l'ATP au niveau du NBD2 induit des changements conformationnels qui empêchent l'hydrolyse de l'ATP au niveau du NBD1. Juste après l'hydrolyse de l'ATP, le NBD2 est dans un état à haut potentiel chimique (hexagone blanc). En bas, à droite : le P_i est libéré du NBD2 et celui-ci se relaxe (carré blanc). Cette relaxation est couplée au mouvement du substrat du site de haute affinité situé du côté intracellulaire vers le site de faible affinité situé du côté extracellulaire. En bas, à gauche : l'ADP est libéré du NBD2 (carré blanc) et le substrat a quitté le site de faible affinité. Pour que le cycle suivant puisse commencer, une molécule de substrat doit se lier au site de haute affinité situé du côté intracellulaire et les deux NBD doivent inverser leurs rôles.

Ce modèle est soutenu et inspiré par un certain nombre de résultats biochimiques sur la P-gp :

- (i) les deux domaines NBD sont capables de fixer l'ATP-Mg²⁺ avec des affinités comparables et sont capables de l'hydrolyser :
 - Al-Shawi *et al.* (1994) ont constaté que deux molécules de *N*-éthylmaléimide (NEM) devaient se fixer à la P-gp pour produire une inhibition maximale de l'activité ATPasique et qu'il y avait un site de liaison du NEM dans chaque moitié de la protéine (TMD1+NBD1 et TMD2+NBD2). En utilisant des mutants de la P-gp où tous les résidus Cys ont été changés en résidus Ala à l'exception du résidu

Cys du Walker A d'un des deux NBD, Loo et Clarke (1995a) ont démontré que les résidus cystéine se trouvant au niveau des deux motifs Walker A constituaient des sites de fixation covalente du NEM et que l'ATP protégeait contre cette modification.

- un analogue photo-activable de l'ATP, le 8-Azido-ATP-Mg²⁺, est capable de se lier covalamment à la P-gp avec une stœchiométrie de 2 mol /mol de P-gp (Al-Shawi *et al.*, 1994). Le 8-azido-ATP-Mg²⁺ se distribue de façon égale entre les deux moitiés de la protéine et sa fixation est inhibée en présence d'ATP.
 - les deux moitiés de la P-gp (TMD1+NBD1 et TMD2+NBD2), produites séparément, présentent chacune une activité ATPasique (Loo et Clarke, 1994). Le niveau basal de cette activité est similaire pour chacune des deux moitiés de la P-gp.
- (ii) les deux NBD sont capables d'interagir, car l'inactivation d'un domaine NBD bloque l'hydrolyse de l'ATP au niveau de l'autre NBD :
- les mutants de la P-gp qui contiennent des mutations Cys-Ala au niveau de toutes les Cys sauf celle du Walker A d'un des deux NBD (Loo et Clarke, 1995a) sont complètement inhibés par le NEM.
 - le 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) inhibe la P-gp en se liant covalamment avec une stœchiométrie de 1,1 mol /mol de P-gp (Al-Shawi et Senior, 1993). Cette fixation est inhibée par l'ATP. Elle se produit sur un résidu appartenant à NBD2 (Urbatsch *et al.*, 1994).
 - des mutations au niveau du Walker A d'un domaine NBD suppriment complètement l'activité ATPasique de la P-gp (Loo et Clarke, 1995a).
 - pour obtenir une inhibition maximale de l'activité ATPasique par l'orthovanadate (VO₄³⁻), une stœchiométrie de 1 mol /mol de P-gp est requise (Urbatsch *et al.*, 1995b). Le complexe ADP-VO₄³⁻-Mg²⁺ reste bloqué soit au niveau du NBD1 soit au niveau de NBD2 (Urbatsch *et al.*, 1995a).
- (iii) l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBD est couplée au transport des substrats :
- des mutations au niveau du Walker A d'un domaine NBD suppriment complètement le transport des substrats par des cellules exprimant la P-gp (Azzaria *et al.*, 1989, Loo et Clarke, 1995a).

Par la suite, plusieurs études ont confirmé certains points du modèle proposé par Alan Senior en 1995 (Senior et Gadsby, 1997, Senior, 1998). Mais d'autres modèles ont aussi été avancés pour expliquer le couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et le transport des substrats de la P-glycoprotéine (Dey *et al.*, 1997, Ambudkar *et al.*, 1999, Sauna et Ambudkar, 2000, 2001, Kerr *et al.*, 2001, Druley *et al.*, 2001, Sauna *et al.*, 2002, Al-Shawi *et al.*, 2003), de son homologue bactérien LmrA (van Veen *et al.*, 2000), du transporteur de l'histidine (Nikaido et Ames, 1999) ou de la protéine TAP (Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002). Des modèles alternatifs ont enfin été inspirés par les structures des protéines MsbA (Chang et Roth, 2001, Chang, 2003, Reyes et Chang, 2005), BtuCD (Locher *et al.*, 2002, Locher, 2004) ou MalK d'*Escherichia coli* (Chen *et al.*, 2003).

Les modèles proposés par le laboratoire de S. V. Ambudkar (Dey *et al.*, 1997, Ambudkar *et al.*, 1999, Sauna et Ambudkar, 2000, 2001, Kerr *et al.*, 2001, Sauna *et al.*, 2002) sont basés sur l'observation qu'après l'hydrolyse de l'ATP, la P-glycoprotéine voit son affinité diminuer aussi bien vis-à-vis de son substrat (Ramachandra *et al.*, 1998, Sauna et Ambudkar, 2000, 2001), que des nucléotides (Sauna et Ambudkar, 2001). Les causes de ces baisses d'affinité ont été attribuées aux changements conformationnels importants accompagnant l'hydrolyse de l'ATP. Pour commencer un nouveau cycle, la P-glycoprotéine doit donc retrouver son état initial. Il a été proposé que l'hydrolyse d'une seconde molécule d'ATP fournisse l'énergie nécessaire à la régénération de cet état initial.

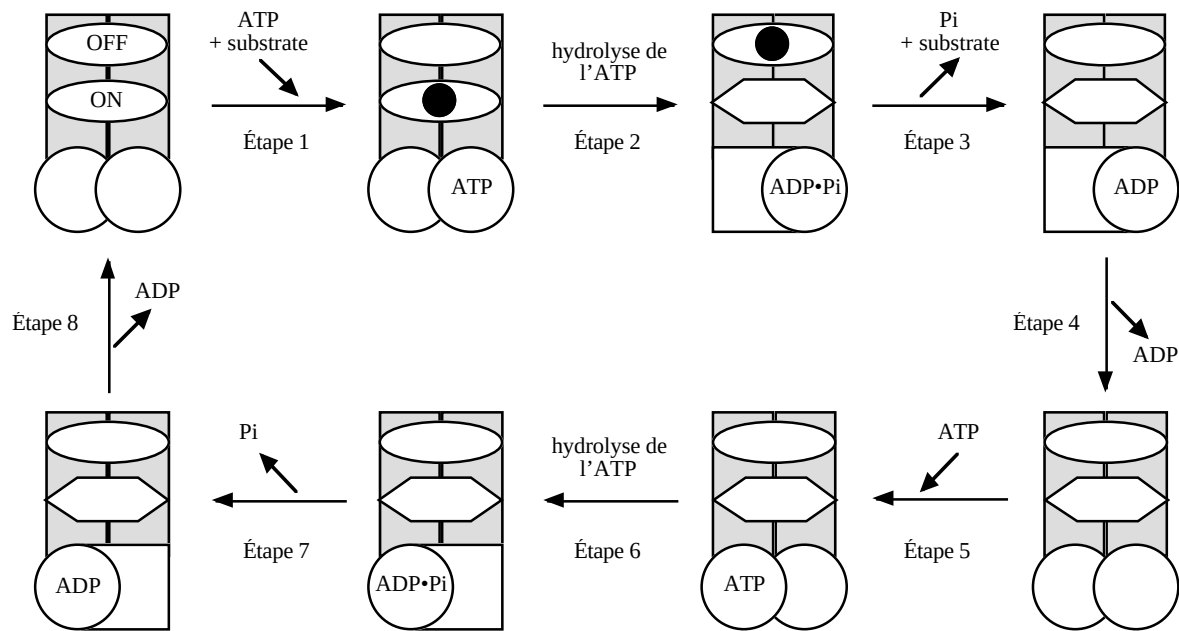


Figure 16. Le "modèle d'hydrolyse alternative de l'ATP au niveau des deux NBD" révisé par le laboratoire de S. V. Ambudkar (d'après Sauna *et al.*, 2002). Les deux domaines NBD sont représentés sous forme de cercles lorsqu'ils ont une haute affinité pour les nucléotides ou des carrés blancs lorsque cette affinité est faible. Les deux domaines TMD sont représentés sous forme de rectangles gris et la molécule de substrat sous forme d'un cercle noir. Les sites de liaison de substrat (le site "ON" et le site "OFF") sont représentés sous forme d'ellipses lorsqu'ils sont à haute affinité. Les hexagones désignent le site "ON" lorsqu'il est à faible affinité. Étape 1 (en haut) : le substrat se lie au niveau du site à haute affinité de la protéine. Une molécule d'ATP se fixe au niveau d'un des deux NBD. Étape 2 (en haut) : l'ATP est hydrolysé et le substrat passe ainsi du site à haute affinité au site à faible affinité. Étape 3 (en haut) : le P_i est libéré du NBD et le substrat quitte le TMD. Étape 4 (à droite) : l'ADP est libéré du NBD. Les deux sites de fixation de l'ATP passent dans un état à haute affinité. Les sites de fixation du substrat restent dans le même état. Étape 5 (en bas) : après la dissociation de l'ADP dans l'étape 4, une autre molécule d'ATP se lie au niveau de l'autre NBD. Étape 6 (en bas) : l'ATP est hydrolysé. Étape 7 (en bas) : le P_i est libéré. Étape 8 (à gauche) : l'ADP est libéré du NBD, ce qui permet à la protéine de retrouver sa configuration d'origine.

Dans le cas de plusieurs protéines contenant deux domaines NBD différents, on observe que les deux domaines fixent l'ATP avec des affinités comparables et l'hydrolysent à des vitesses comparables. Cela a été clairement démontré pour des protéines comme la P-gp (Al-Shawi *et al.*, 1994, Loo et Clarke, 1994, 1995a, Urbatsch *et al.*, 1995a, b, Hrycyna *et al.*, 1998, Sauna et Ambudkar, 2001) ou TAP (Muller *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1994).

Cependant, certaines protéines ABC possèdent des domaines NBD atypiques présentant des substitutions au niveau des acides aminés des motifs conservés, ce qui pourrait empêcher ces domaines d'hydrolyser efficacement l'ATP. C'est le cas, par exemple, de la protéine CFTR. Le NBD1 ne possède ni le glutamate du Walker B, ni l'histidine de la boucle H (ces résidus

étant remplacés par des sérines) et le NBD2 possède un motif signature LSHGH (au lieu de LSGGQ). Ainsi, dans CFTR, le site ATPasique formé par le NBD1 et le motif signature du NBD2 serait capable de fixer l'ATP, mais il l'hydrolyserait beaucoup moins vite que le site formé par le NBD2 et le motif signature du NBD1 (Aleksandrov *et al.*, 2002).

Une asymétrie des domaines NBD semble exister aussi chez d'autres protéines ABC. Dans le cas des protéines MRP1 (Yang *et al.*, 2003) ou SUR1 (Ueda *et al.*, 1999), le NBD1 a une plus grande affinité pour l'ATP que le NBD2, tandis que le NBD2 hydrolyse l'ATP plus efficacement que le NBD1. Ce comportement pourrait s'expliquer par le fait que le résidu Glu suivant immédiatement l'Asp conservé du Walker B est remplacé par un Asp dans le NBD1, ce qui entraînerait une augmentation de l'affinité pour l'ATP et une diminution de l'activité ATPasique (Payen *et al.*, 2003). Une certaine asymétrie a aussi été montrée pour le transporteur de l'histidine bactérien qui contient deux domaines NBD identiques (HisP) (Kreimer *et al.*, 2000), pour la protéine TAP (Daumke et Knittler, 2001, Chen *et al.*, 2004) et même pour la P-glycoprotéine (Hrycyna *et al.*, 1999, Julien et Gros, 2000, Carrier *et al.*, 2003).

L'asymétrie des domaines NBD au niveau de leur capacité à fixer et à hydrolyser l'ATP suggère que les deux NBD puissent jouer des rôles différents dans le mécanisme de transport. Dans le cas de CFTR (Berger *et al.*, 2005) et MRP1 (Yang *et al.*, 2005), il a même été récemment suggéré que, pour que la protéine fonctionne, l'ATP devait se fixer aux deux NBD, mais qu'il ne pouvait être hydrolysé qu'au niveau du NBD2. Ce comportement a été également évoqué pour le transporteur de l'histidine bactérien HisQMP₂ (Nikaido et Ames, 1999), qui a deux sites ATPasiques actifs équivalents. Ainsi, lorsqu'un NBD porte des mutations permettant la fixation de l'ATP, mais n'empêchant pas son hydrolyse par l'autre NBD (une mutation de l'histidine de la boucle H), le transport des substrats n'est pas aboli. Il est juste réduit. Cependant, dans la plupart des cas, l'incapacité d'un NBD à hydrolyser l'ATP bloque l'hydrolyse au niveau de l'autre NBD (Al-Shawi et Senior, 1993, Urbatsch *et al.*, 1994, 1995a,b, 1998, 2000, Loo et Clarke, 1995a). Cette observation démontre l'existence d'une interaction entre les deux NBD.

Asymétriques ou non, les deux NBD d'une protéine ABC sont capables de s'associer en modifiant chacun les propriétés de l'autre NBD. Des nombreuses données biochimiques soutiennent l'idée que la fixation de l'ATP est coopérative, c'est-à-dire que, lorsqu'un domaine NBD fixe l'ATP, l'affinité de l'autre NBD pour l'ATP est augmentée. Cela a été démontré, par exemple, pour le transporteur de l'histidine (Nikaido *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1997), la MRP1

(Payen *et al.*, 2003, Hou *et al.*, 2003) ou la P-gp (Hrycyna *et al.*, 1999). Cette coopérativité est visible aussi au niveau de l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, l'activité ATPasique des domaines NBD ne suit pas une cinétique classique de type Michaelis-Menten, mais est plutôt conforme au modèle de Hill avec un coefficient de $\sim 1,7$ (compris entre 1,5 et 2 en fonction du pH) (Davidson *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1997, Moody *et al.*, 2002, Janas *et al.*, 2003, Benabdelhak *et al.*, 2005). Cela indique la participation coopérative d'au moins deux sites (deux NBD) à la réaction catalytique. La participation de résidus appartenant aux deux domaines NBD dans la fixation de chacune des deux molécules d'ATP peut expliquer cette coopérativité.

Récemment, tous ces modèles ont été remis en question, car de nouvelles données biochimiques et structurales indiquent que l'énergie du transport serait plutôt fournie par la fixation de l'ATP, que par l'hydrolyse de l'ATP. Cette énergie permettrait à la protéine de retrouver sa conformation initiale. En effet, la fixation de l'ATP ou de ses dérivés non-hydrolysables au niveau des NBD induit :

- (i) une baisse d'affinité des transporteurs ABC pour leurs substrats (démonstré pour la P-glycoprotéine (Rosenberg *et al.*, 2001b, Martin *et al.*, 2000b, 2001) ou la MRP1 (Payen *et al.*, 2003)). Cette baisse suggère que le réarrangement du site de fixation du substrat (passage d'un site à haute affinité à un site à faible affinité) précède l'hydrolyse de l'ATP.
- (ii) l'ouverture du canal CFTR (Aleksandrov *et al.*, 2000, Vergani *et al.*, 2003).
- (iii) des changements conformationnels au niveau des TMD, mis en évidence par spectroscopie, fluorescence, protéolyse, cross-linking, cristallographie bidimensionnelle, dans le cas de protéines ABC comme MRP1 (Manciu *et al.*, 2003), HisPQM (Kreimer *et al.*, 2000), LmrA (Vigano *et al.*, 2000), CFTR (Rosenberg *et al.*, 2004) ou P-gp (Sonveaux *et al.*, 1999, Rosenberg *et al.*, 2001b, 2003, 2005).
- (iv) la dimérisation des domaines NBD (voir *Le fonctionnement des domaines NBD*).

En partant de cette idée, Higgins et Linton ont proposé en 2004 le modèle "ATP switch" pour décrire le mécanisme de couplage entre la fixation de l'ATP, son hydrolyse et le transport des substrats par les protéines ABC (Higgins et Linton, 2004). Le schéma pour le cas d'un exportateur de produits toxiques est représenté dans la figure 17.

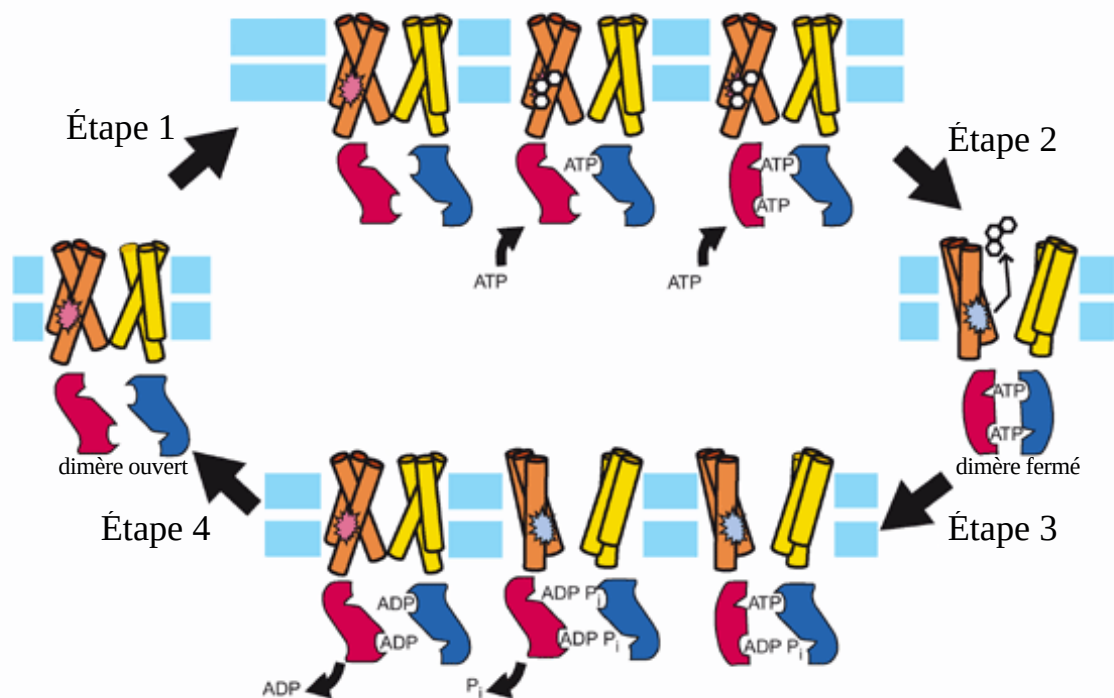


Figure 17. Le modèle "ATP switch" (d'après Higgins et Linton, 2004). Les TMD sont représentés sous forme de cylindres jaunes et oranges et les NBD sous forme irrégulière, en rouge ou en bleu. Au milieu, à gauche : le transporteur est dans son état basal. Les deux NBD forment un dimère dans une configuration ouverte, avec une faible affinité pour l'ATP. Le site de liaison du substrat sur les TMD (en rose) est dans un état de haute affinité et orienté vers la membrane. Étape 1 (en haut) : le cycle de transport commence par la liaison du substrat (trois hexagones blancs) au niveau du site à haute affinité. L'affinité des NBD pour l'ATP est augmentée. Deux molécules d'ATP se lient successivement, ce qui permet de former le dimère fermé et de rendre ce dimère compétent pour l'hydrolyse. Étape 2 (au milieu, à droite) : la formation du dimère fermé provoque des changements de conformation dans les TMD. Le site de fixation du substrat (en gris clair) est exposé du côté extracellulaire et son affinité est réduite. Les auteurs postulent que le substrat est libéré à cette étape. Étape 3 (en bas) : L'ATP est hydrolysé. Dans le cas général, les deux molécules d'ATP seraient hydrolysées de manière séquentielle, mais, pour quelques transporteurs ABC, il se pourrait que seul un ATP soit hydrolysé (l'hydrolyse d'une seule molécule d'ATP pourrait être suffisante pour déstabiliser le dimère des NBD). Étape 4 : La libération séquentielle du P_i , puis de l'ADP, redonne au transporteur sa configuration initiale.

Même si les modèles proposés jusqu'ici apportent des éclaircissements sur le fonctionnement des protéines ABC, un grand nombre de problèmes restent en suspens.

Ainsi, nous ne pouvons pas conclure avec certitude s'il y a fixation ordonnée des substrats. Si c'est le cas, quel est le substrat qui interagit en premier avec le transporteur ABC : l'ATP ou la molécule transportée. On peut imaginer qu'il y a une fixation "random" de l'ATP et du substrat, mais que l'hydrolyse de l'ATP n'est possible que lorsque le substrat a été fixé.

Cependant, des cycles futiles ont été observés chez certains transporteurs ABC, comme, par exemple, la P-glycoprotéine (Al-Shawi *et al.*, 2003).

Nous ne savons pas non plus combien de molécules d'ATP sont hydrolysées à l'occasion du transport d'une molécule de substrat. La mesure de la stœchiométrie de transport s'avère difficile. Des valeurs comprises entre 0,5 et 3 (même 50) molécules d'ATP hydrolysées pour le transport d'une molécule de substrat ont été rapportées pour différents transporteurs (Eytan *et al.*, 1996, Ambudkar *et al.*, 1997, Shapiro et Ling, 1998, Patzlaff *et al.*, 2003). On ne sait pas non plus comment est déclenchée l'hydrolyse de l'ATP. Le substrat agit-il lors de sa fixation ou lors de sa libération ? Ou, au contraire, l'hydrolyse de l'ATP est-elle une conséquence directe de la géométrie du site actif induite par la dimérisation des NBD ?

Intérêt de la levure comme organisme modèle pour l'étude des protéines ABC

Comme on l'a déjà mentionné ci-dessus, les protéines ABC sont importantes pour la santé humaine, notamment parce que plusieurs d'entre elles sont associées à des maladies génétiques et parce que leur surexpression à la suite d'amplifications géniques peut conduire à la résistance de cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques.

Le séquençage complet du génome humain a révélé la présence de 49 protéines ABC. L'organisation des domaines NBD et les homologies de séquence ont permis de définir 7 sous-familles distinctes parmi ces protéines : ABCA → ABCG (Allikmets *et al.*, 1996, Dean *et al.*, 2001a, b, <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>).

Par ailleurs, le séquençage des génomes d'autres espèces ont révélé des nombreuses protéines proches des protéines humaines. Ainsi, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les 29 transporteurs ABC identifiés (Decottignies et Goffeau, 1997) peuvent être classés en 7 sous-familles, dont 6 correspondent aux sous-familles ABCB → ABCG humaines. Dans tous les cas, les protéines humaines et de levure d'une même sous-famille sont plus proches entre elles que les protéines de sous-familles différentes d'un même organisme. L'arbre phylogénétique des protéines ABC humaines et de levures montre bien ces homologies (figure 18).

L'étude des protéines de levure peut donc fournir des informations qui permettront ensuite de guider l'étude des protéines humaines. L'exemple des protéines Pxa1p et Pxa2p illustre l'intérêt de ce type d'approche. Ces deux protéines de levure ont été identifiées grâce à leur

homologie avec les protéines humaines ABCD1 et ABCD2, impliquées dans l'adrénoleucodystrophie. Au début, les connaissances sur les protéines humaines ont facilité l'étude des protéines de levure homologues. Par la suite, c'est le contraire qui s'est produit et l'étude des protéines humaines a grandement bénéficié des informations obtenues chez la levure sur Pxa1p et Pxa2p (Taglicht et Michaelis, 1998).

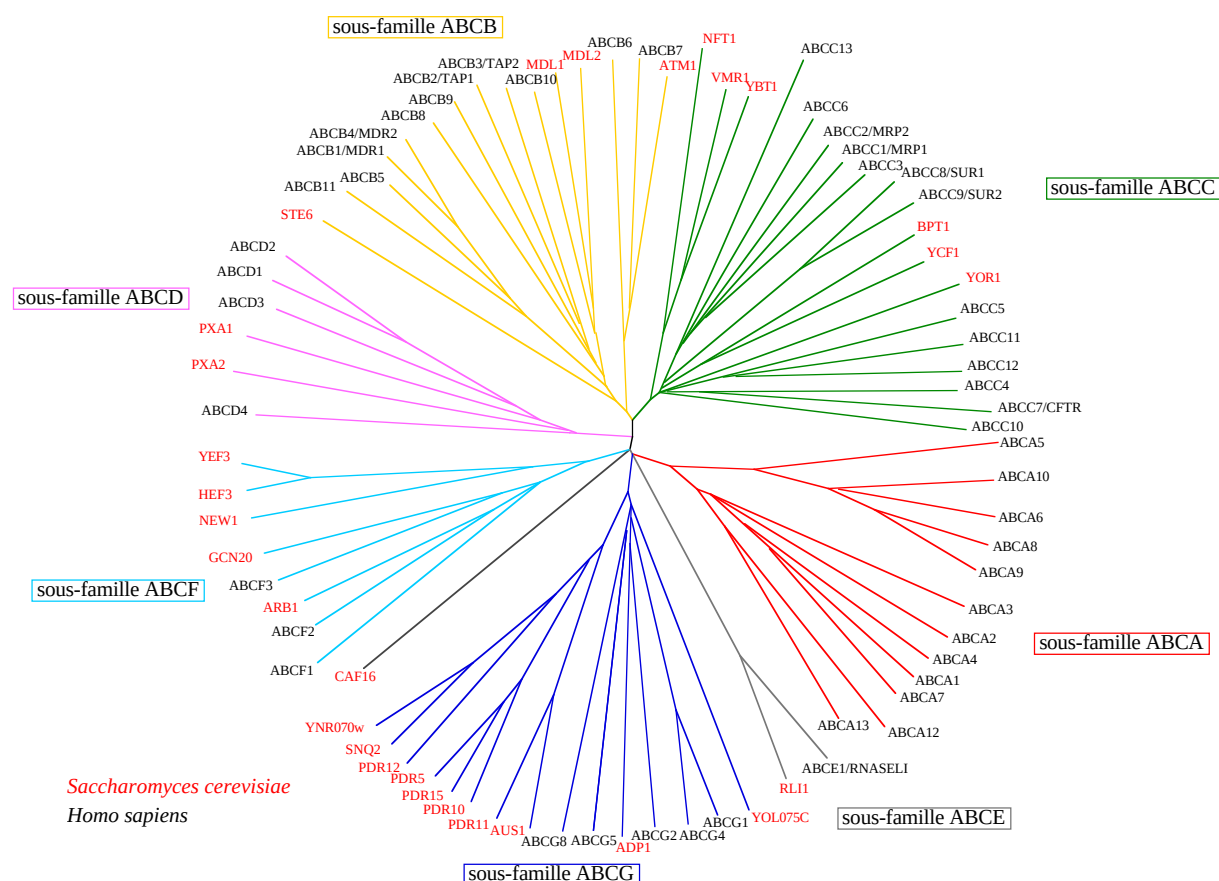


Figure 18. Arbre phylogénétique des protéines ABC humaines et de levure. Cet arbre a été dessiné par le logiciel TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) à partir des alignements des séquences complètes de protéines ABC générés par le logiciel ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Les noms de protéines ABC humaines sont indiqués en noir et ceux des protéines ABC de levure en rouge.

Nous avons choisi au laboratoire de nous intéresser plus particulièrement à la sous-famille ABCC (figure 19). On retrouve dans cette sous-famille 13 protéines ABC humaines, dont plus de la moitié ont une importance clinique majeure. Chez la levure, la sous-famille homologue (sous-famille II.1) comprend 6 transporteurs. A l'exception des protéines humaines CFTR, MRP4, MRP5, MRP11, MRP12 et de la protéine Yor1p de la levure, tous les transporteurs de cette sous-famille possèdent un domaine N-terminal additionnel (TMD0).

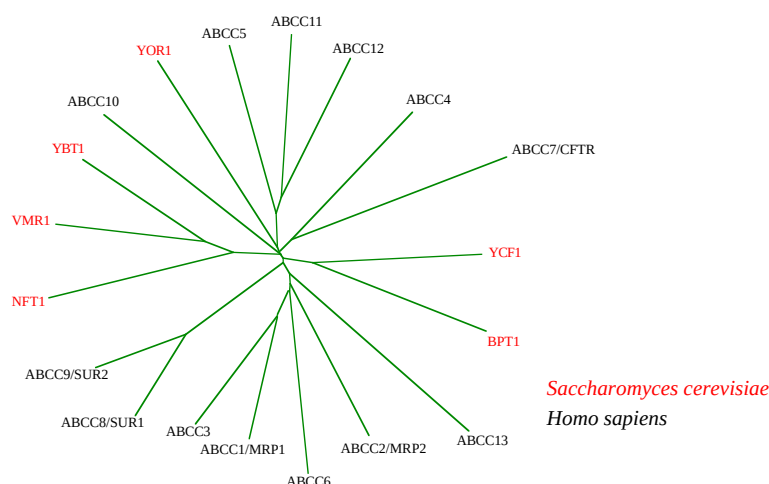


Figure 19. Arbre phylogénétique des protéines ABC humaines appartenant à la sous-famille ABCC et des protéines de levure apparentées. Cet arbre a été dessiné par le logiciel TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) à partir des alignements des séquences complètes de protéines ABC générés par le logiciel ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Les noms des protéines ABC humaines sont indiqués en noir et ceux des protéines ABC de levure en rouge.

La protéine MRP1 /ABCC1 (Cole *et al.*, 1992) est un polypeptide de 190 kDa exprimé normalement dans tous les tissus, sauf, peut-être, le foie adulte sain. Elle est impliquée dans la protection des cellules contre la toxicité de certains xénobiotiques, en transportant vers l'extérieur de la cellule des composés divers. Il s'agit souvent, mais pas toujours, d'adduits du glutathion ou du glucuronate (Leslie *et al.*, 2005). Un rôle physiologique de MRP1 consiste également à transporter le leucotriène C4 (LTC4) (Leier *et al.*, 1994), une molécule impliquée dans la réponse inflammatoire. Par ailleurs, de nombreuses données expérimentales indiquent que MRP1 est surexprimée dans diverses tumeurs, et que cette surexpression est impliquée dans les processus de résistance multiple des cellules cancéreuses aux traitements anti-tumoraux.

MRP2 /cMOAT /ABCC2 (Büchler *et al.*, 1996) est une protéine de 1545 acides aminés localisée dans la membrane apicale des cellules du foie, de l'intestin, des reins et des bronches. Une de ses fonctions est d'exporter des anions organiques hors des hépatocytes vers la bile, mais sa capacité à transporter des produits toxiques ou des leucotriènes a aussi été mise en évidence (Cui *et al.*, 1999). Plusieurs mutations du gène de cette protéine ont été observées chez des patients atteints par le syndrome de Dubin-Johnson (Paulusma *et al.*, 1996), qui se traduit, en particulier, par une hyperbilirubinémie. Comme MRP1, MRP2 peut être impliquée dans les phénomènes de résistance des cellules tumorales aux traitements anti-cancéreux.

Il en est de même pour les protéines MRP3 /MOATD /ABCC3 (Kiuchi *et al.*, 1998), MRP4 /MOATB /ABCC4, MRP5 /MOATC /ABCC5 (Kool *et al.*, 1997), ainsi que pour MRP7 /ABCC10 (Hopper *et al.*, 2001, Hopper-Borge *et al.*, 2004), MRP8 /ABCC11 (Tammur *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2005) et, probablement, MRP9 /ABCC12 (Tammur *et al.*, 2001).

MRP6 /ABCC6 (Kool *et al.*, 1999), un polypeptide de 1503 acides aminés, est fortement exprimé dans les cellules hépatiques et rénales. Cette protéine transporte de petits peptides, ainsi que des composés conjugués au glutathion comme le LTC₄ (Belinsky *et al.*, 2002). Des mutations dans le gène de cette protéine sont à l'origine d'une maladie récessive caractérisée par une calcification anormale des tissus, le *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) (Ringpfeil *et al.*, 2000).

La protéine CFTR /ABCC7, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, est la plus connue et la plus étudiée des protéines de la famille ABCC. C'est un polypeptide de 1480 acides aminés, de masse moléculaire 168 kDa (Riordan *et al.*, 1989), qui forme un canal chlore et, de ce fait, joue un rôle crucial dans le transfert d'eau à travers les barrières épithéliales (pour revue, Riordan, 2005). Cette protéine pourrait également intervenir dans la régulation d'autres canaux ioniques, tels que les canaux chlore ORCC (*outwardly rectified chloride channels*) (Jovov *et al.*, 1995), les canaux potassium ROMK (*renal outer modullary K⁺ channels*) (McNicholas *et al.*, 1996, Konstas *et al.*, 2002), les canaux sodium épithéliaux (Stutts *et al.*, 1995, Reddy *et al.*, 1999) ou certains canaux Cl⁻ /HCO₃⁻ (Lee *et al.*, 1999, Choi *et al.*, 2001). Il a été également montré que CFTR pouvait transporter des anions organiques comme le benzoate, le pyruvate ou le glucuronate (Linsdell et Hanrahan, 1998a), et même du glutathion (Linsdell et Hanrahan, 1998b, Kogan *et al.*, 2003). L'absence ou le dysfonctionnement de CFTR cause la mucoviscidose (Welsh et Smith, 1995). La mutation la plus fréquente associée à la mucoviscidose est la délétion du résidu phénylalanine en position 508 (Δ F508). Cette mutation empêche le repliement correct de CFTR, sa maturation, son transport vers la membrane apicale et baisse son activité de plus de 10 fois lorsque la protéine est localisée dans la membrane plasmique (Wang *et al.*, 2005). En conséquence, les cellules épithéliales sont incapables de réguler correctement le transport des ions. Plus d'un millier d'autres mutations associées à la mucoviscidose ont été identifiées. Certaines empêchent la maturation et le transport de CFTR vers la membrane apicale, d'autres produisent des formes sans activité physiologique.

Les gènes ABCC8 et ABCC9 codent des protéines ABC qui pourraient ne pas avoir d'activité de transport. SUR1 /ABCC8 (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995) est localisée dans les cellules pancréatiques. C'est une protéine qui régule l'activité de canaux de potassium sensibles à l'ATP. Son nom (SUR, *sulfonylurea receptor*) vient du fait qu'elle fixe avec une haute affinité les médicaments de la classe des sulfonylurées. SUR2 /ABCC9 (Inagaki *et al.*, 1996), qui est également une protéine régulatrice de canaux potassium, est un récepteur de faible affinité pour ces mêmes médicaments. SUR2 existe sous deux isoformes codées par le même gène, mais résultant d'un épissage alternatif : SUR2A est exprimée dans les cellules des muscles squelettiques et du myocarde, et SUR2B dans les muscles lisses. SUR1 et SUR2 font partie d'un complexe hétéro-octamérique formé par 4 sous-unités SUR et 4 sous-unités Kir6.1 ou Kir6.2, *inwardly-rectifying potassium channel 1 ou 2*. Ce complexe forme un canal potassium inhibé par l'ATP et stimulé par l'ADP (revue par Gribble et Reimann, 2003). Les sulfonylurées sont utilisés en clinique pour augmenter la sécrétion d'insuline chez les patients atteints de diabète indépendant de l'insuline. En effet, en réponse aux sulfonylurées, SUR1 ferme le canal potassium auquel elle est associée (Schwanstecher *et al.*, 1998). Il en résulte une dépolarisation de la membrane, d'où une entrée d'ions calcium et, finalement, une stimulation de la production d'insuline par les cellules du pancréas. Pour les mêmes raisons, des mutations dans le gène de la protéine SUR1 sont la cause d'une maladie récessive, l'hypoglycémie hyperinsulinémique infantile (Thomas *et al.*, 1995).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les 6 protéines (Decottignies et Goffeau, 1997) particulièrement proches des protéines humaines de la sous-famille ABCC sont : Yor1p, Ycf1p, Bpt1p /Yll015wp, Ybt1p /Bat1p, Vmr1p /Yhl035cp, Nft1p / YKR103-104wp.

Yor1p, *yeast oligomycin resistance 1* (Katzmann *et al.*, 1995), est un polypeptide de 1477 acides aminés, de 166 kDa, qui se trouve dans la membrane plasmique (Katzmann *et al.*, 1999). Il a été montré que l'inactivation de *YOR1* augmentait la sensibilité de la levure à l'oligomycine, à plusieurs acides organiques (acétique, propionique, benzoïque), à la révéromycine A, à la tautomycine, à la leptomycine B (Cui *et al.*, 1996) ou à l'auréobasidine A (Ogawa *et al.*, 1998). De plus, il a été rapporté qu'une surexpression de Yor1p était à l'origine d'une augmentation de la résistance de la levure au cadmium, mais pas à d'autres métaux comme le sodium, le manganèse, le cuivre ou le zinc (Cui *et al.*, 1996). Par la suite, il a été montré que Yor1p était impliquée dans la détoxification d'autres produits et qu'elle avait des spécificités de substrat chevauchantes avec celles de Prd5p et Snq2p, deux protéines

centrales dans le phénomène MDR (*multidrug resistance*) chez la levure (Kolaczkowski *et al.*, 1998, Rogers *et al.*, 2001). Par exemple, parmi les substrats communs avec Pdr5p, on peut citer la tétracycline, la doxorubicine ou la valinomycine. Yor1p pourrait également être une flippase de lipides, car son absence dans la membrane plasmique se traduit par une accumulation de phosphatidyléthanolamine dans la cellule (Decottignies *et al.*, 1998). Sa capacité à transporter des sphingolipides a été également suggérée (Boujaoude *et al.*, 2001). Le gène *YOR1* est régulé par les facteurs de transcription Pdr1p et Pdr3p (Katzmann *et al.*, 1995), Yrr1p /Pdr2p /Yor162cp (Zhang *et al.*, 2001), Ylr266cp /Pdr8p (Hikkel *et al.*, 2003), Yor172wp /Yrm1 (Lucau-Danila *et al.*, 2003) et Ykl222cp (Onda *et al.*, 2004).

Ycf1p, *yeast cadmium factor 1*, est une protéine qui a été identifiée par le fait que sa surproduction confère aux levures une résistance accrue au cadmium (Szczypka *et al.*, 1994). C'est une protéine de la membrane vacuolaire, qui possède, en plus des 4 domaines classiques d'un transporteur ABC, un domaine N-terminal additionnel (TMD0), ainsi qu'un domaine régulateur R. Le domaine TMD0 est formé par 5 hélices transmembranaires (Hipfner *et al.*, 1997). Il est important pour la localisation vacuolaire de Ycf1p (Mason et Michaelis 2002). Le domaine R ressemble à celui de CFTR. Il est plus petit (~150 acides aminés chez Ycf1p et ~250 chez CFTR) et est le site de plusieurs phosphorylations importantes pour la fonction biologique de la protéine (Eraso *et al.*, 2004). Dans la cellule, Ycf1p subit une protéolyse partielle au niveau de la boucle qui relie, du côté cytoplasmique, les hélices transmembranaires 1 et 2 du TMD1 (Wemmie et Moye-Rowley, 1997, Ren *et al.*, 2000, Mason et Michaelis 2002, Mason *et al.*, 2003). Cette protéolyse ne semble pas modifier l'activité de la protéine. Ycf1p est responsable du transport vers la vacuole de substances organiques conjuguées au glutathion (Li *et al.*, 1996, Chaudhuri *et al.*, 1997), de complexes formés par le glutathion et le cadmium (Li *et al.*, 1997), l'arsenic, le nickel, l'antimoine, (Ghosh *et al.*, 1999) ou le mercure (Gueldry *et al.*, 2003), mais aussi de composés non conjugués au glutathion comme la bilirubine (Petrovic *et al.*, 2000). Paradoxalement, l'inactivation du gène *YCF1* augmente la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au sélénite (Pinson *et al.*, 2000) ou au paracétamol (Srikanth *et al.*, 2005). En transportant vers la vacuole l'adduit Se(GS)_2 , Ycf1p pourrait ainsi empêcher la conversion du sélénium en composés peu toxiques (ex. sélénométhionine) par des enzymes du cytoplasme. Ycf1p transporte également du glutathion libre (Rebbeor *et al.*, 1998a, b) ou des complexes formés par le glutathion et les leucotriènes comme le LTC₄, qui sont des substrats naturels de MRP1 (Falcon-Perez *et al.*, 1999). Le gène *YCF1* est régulé par les facteurs de transcription Yap1p et

Yap2p (Wemmie *et al.*, 1994, Sharma *et al.*, 2002). Il a été montré que son expression était induite en présence de Cd, d'adénine (Sharma *et al.*, 2002) ou de Hg (Gueldry *et al.*, 2003).

Bpt1p, *bile pigment transporter 1*, le produit du gène *YLL015w*, est une protéine très homologue à Ycf1p. Comme Ycf1p, Bpt1p est localisée dans la membrane vacuolaire et intervient dans la détoxification du Cd. Elle est aussi capable de transporter vers la vacuole du glutathion libre ou des composés conjugués au glutathion ou au glucuronate (Klein *et al.*, 2002, Sharma *et al.*, 2002). Des composés non conjugués au glutathion, comme la bilirubine (Petrovic *et al.*, 2000), ou des produits utilisées comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (Pascolo *et al.*, 2001) sont substrats de Ycf1p, comme de Bpt1p. Néanmoins, la spécificité de Bpt1p est différente de celle de Ycf1p. Bpt1p semble préférer comme substrat le glutathion libre et les composés conjugués au glucuronate (Sharma *et al.*, 2002) et son expression ne semble pas régulée par le facteur de transcription Yap1p (Sharma *et al.*, 2002).

Sur les trois autres protéines de cette sous-famille (Ybt1p /Bat1p, Vmr1p /Yhl035cp, Nft1p /YKR103-104wp), les connaissances sont très réduites.

Ybt1p /Bat1p, *yeast bile acid transporter 1* /*bile acid transporter 1*, semble localisée dans la membrane vacuolaire de la levure (Ortiz *et al.*, 1997). Comme Ycf1p et Bpt1p, Bat1p est responsable du transport vers la vacuole du composé qui est à l'origine de la coloration rouge des levures *ade1 /ade2* (Sharma *et al.*, 2003). Cependant, Bat1p ne transporte pas le DNP-GS (Ortiz *et al.*, 1997) ce qui suggère une certaine sélectivité de Bat1p vis-à-vis des conjugués du glutathion. Cette protéine est capable de transporter également des acides biliaires (Ortiz *et al.*, 1997).

Vmr1p /Yhl035cp, *vacuolar multidrug resistance 1*, est probablement localisée dans la mitochondrie (Sickmann *et al.*, 2003). Elle pourrait être impliquée dans l'homéostasie du fer et du cuivre (De Freitas *et al.*, 2004, van Bakel *et al.*, 2005), car son expression est sous le contrôle de Aft1p /Aft2p, des facteurs de transcription impliqués dans l'homéostasie de ces métaux. L'analyse de la séquence promotrice du gène *YHL035c* a montré la présence d'un élément spécifique de Aft1p. La banque de données des protéines de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>) suggère également que Vmr1p puisse être impliquée dans la résistance au cadmium.

Le locus *YKR103w-YKR104w* est particulier. On ignorait jusqu'à récemment s'il correspondait à un gène fonctionnel, car, dans certaines souches de levure, un codon stop sépare la séquence

en deux portions (Decottignies et Goffeau, 1997). On sait maintenant que, dans plusieurs souches sauvages de levure, ce codon stop est remplacé par une tyrosine et que ce locus code alors vraisemblablement une protéine ABC fonctionnelle : Nft1p, *new full-length MRP-type transporter 1* (Mason *et al.*, 2003). Son rôle n'est pas connu, mais des différences portant sur la résistance de souches $\Delta ycf1$ au Cd ou à l'As pourraient être dues à la présence ou à l'absence de cette protéine (Mason *et al.*, 2003).

Une délétion des résidus phénylalanine en position 713 dans Ycf1p ($\Delta F713$) ou 680 dans Yor1p ($\Delta F680$), équivalents de la F508 de CFTR et de la F728 de MRP1 d'après les alignements de séquence, abolit la capacité de ces protéines à conférer la résistance au cadmium ou à l'oligomycine, respectivement. Ce n'est pas l'expression de ces protéines qui est affectée par la délétion, mais leur localisation (Wemmie et Moye-Rowley, 1997, Katzmann *et al.*, 1999). Elles ne sont plus adressées correctement et restent dans le réticulum endoplasmique où elles sont dégradées par le protéasome. Le comportement de Ycf1p $\Delta F713$ et Yor1p $\Delta F680$ reproduit donc celui de CFTR $\Delta F508$ (Cheng *et al.*, 1990) ou celui de MRP1 $\Delta F728$ (Buyse *et al.*, 2004), accentuant ainsi la ressemblance entre les protéines humaines et les protéines de levure.

Ces résultats, ainsi que les similarités de séquence, suggèrent que l'étude de protéines de levure de la sous-famille II.1 est susceptible d'apporter des informations qui pourront ensuite être extrapolées aux protéines humaines de la sous-famille ABCC.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux protéines Yor1p et Ycf1p.

Dans un premier temps, nous avons tiré profit du système d'expression basé sur la mutation du gène du facteur de transcription Pdr1p pour surproduire dans la levure la protéine Yor1p. À son gène, nous avons ajouté une séquence codant un peptide de poly-histidine, afin de permettre, après solubilisation, la purification de cette protéine ABC recombinante par chromatographie d'affinité sur des colonnes greffées avec des ions métalliques. Par ailleurs, nous avons utilisé les souches que nous avons construites pour préciser l'implication de Yor1p dans la résistance de la levure à différents produits toxiques et caractériser l'activité ATP-ase de la protéine Yor1p dans des extraits membranaires. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le *Chapitre I*. Ensuite, nous avons mis au point une méthode

permettant de solubiliser puis de purifier à homogénéité la protéine Yor1p. Cependant, la préservation de cette protéine dans un état fonctionnel s'est avérée plus difficile que prévu.

D'autre part, nous avons produit sous forme isolée chez la bactérie *Escherichia coli* et purifié à homogénéité les deux domaines NBD de Yor1p impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Dans le *Chapitre II* sont présentés les résultats de l'étude de leur activité ATPasique, ainsi que de la fixation de l'ATP sur ces domaines en utilisant des dérivés photo-activables ou fluorescents de l'ATP.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle d'Ycf1p dans le métabolisme du sélénium. En effet, nous avons montré au laboratoire que Ycf1p jouait un rôle dans la détoxification du mercure (Gueldry *et al.*, 2003). Récemment, la protéine Ycf1p a également été impliquée dans la toxicité du sélénite (Pinson *et al.*, 2000). Mais de façon surprenante, dans le cas du sélénite, l'inactivation du gène *YCF1* entraîne une résistance accrue, alors que c'est le contraire qui se produit avec le mercure. Il nous a donc paru intéressant de comparer le rôle d'Ycf1p dans la réponse de la levure au sélénite et au mercure. A cette occasion, nous avons constaté que la toxicité du sélénite pour la levure était considérablement accrue par la présence de composés thiolés. Les expériences décrites au *Chapitre III* suggèrent que la formation d'ions superoxyde est vraisemblablement à l'origine de cette hypertoxicité.

Résultats

Chapitre I

Étude de la protéine Yor1p

Expression fonctionnelle de Yor1p dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le système d'expression

Le système d'expression que nous avons choisi pour surproduire dans la levure la protéine Yor1p a été développé dans le laboratoire d'A. Goffeau. Il a déjà été utilisé avec succès pour surproduire cette protéine, ainsi que les protéines ABC Pdr5p et Snq2p (Decottignies *et al.*, 1994, 1995, 1998). Il repose sur l'utilisation d'une souche de levure (US50-18C) portant la mutation *PDR1-3* dans le gène du facteur de transcription Pdr1p, ce qui fait que les gènes sous contrôle de ce facteur de transcription sont très fortement exprimés (Balzi *et al.*, 1987). À partir de cette souche, des délétions multiples ont été réalisées d'une manière séquentielle. Plusieurs gènes de transporteurs ABC, ainsi que le gène du facteur de transcription Pdr3p, ont été ainsi inactivés pour créer une centaine de souches (Decottignies *et al.*, 1998, Rogers *et al.*, 2001).

Nous avons choisi d'utiliser la souche SUPERYOR, dans laquelle le gène *YOR1* se trouve au niveau du locus *PDR5*, sous le contrôle du promoteur de *PDR5* (Decottignies *et al.*, 1998). Le promoteur de *PDR5* a été choisi car, dans cette souche, il est plus fort que celui de *YOR1*, vraisemblablement parce qu'il contient 3 séquences reconnues par Pdr1p, alors que le promoteur *YOR1* n'en contient qu'une (Katzmann *et al.*, 1995, 1996). Dans la souche SUPERYOR, le gène du facteur de transcription Pdr3p est inactivé, ainsi que ceux de 6 transporteurs ABC (*PDR5*, *PDR10*, *PDR11*, *SNQ2*, *YOR1*, *YCF1*).

Afin de pouvoir purifier la protéine par chromatographie d'affinité sur des colonnes greffées avec des ions métalliques, nous avons modifié le gène de la protéine Yor1p dans la souche SUPERYOR de façon à ajouter une séquence codant un peptide de poly-histidine à son extrémité 3'-terminale. Nous avons ainsi créé les souches SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ pour produire les protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀, respectivement.

En plus du peptide de poly-histidine, la séquence des ces deux protéines diffère de celle de Yor1p native par l'insertion d'un résidu de glycine entre les deux derniers résidus C-terminaux. L'extrémité C-terminale est Arg-Ser pour la protéine native et Arg-Gly-Ser-

(His)_{6 ou 10} pour Yor1p-(His)_{6 ou 10}. L'insertion d'un résidu de glycine a été réalisée pour permettre l'immunodétection de la protéine par des anticorps anti RGS-His.

Toutes ces constructions ont été insérées par recombinaison homologue au niveau du locus *PDR5* dans la souche SUPERYOR. Pour cela, la levure a été transformée avec un fragment d'ADN de ~2000 pb contenant la partie 3'-terminale du gène *YOR1*, une séquence codant le motif Arg-Gly-Ser-(His)_{6 ou 10}, le gène *KAN^R* (avec le promoteur et le terminateur du gène *TEF*) et la partie 5'-terminale du gène *PDR5* (figure 20). La sélection des clones transformés a été réalisée sur un milieu contenant de la généticine (les détails de ce protocole sont décrits dans la partie *Matériels et méthodes*).

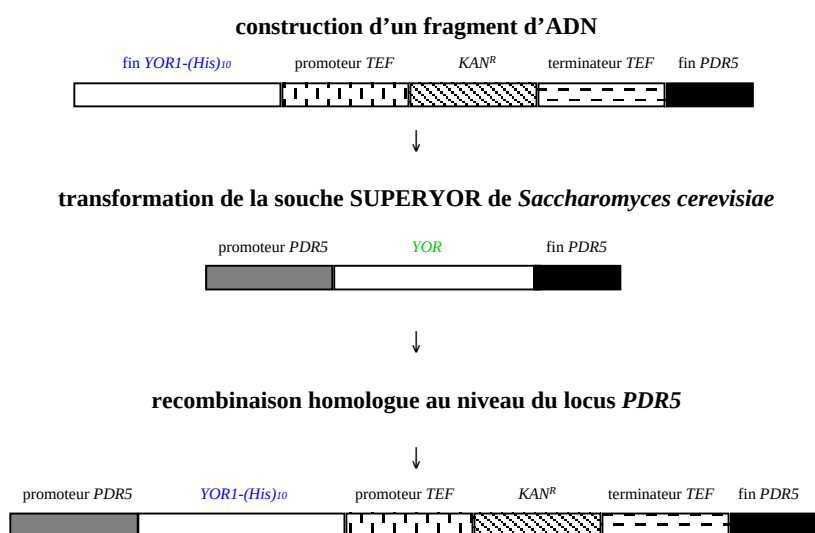


Figure 20. Principe de la construction des souches produisant la protéine Yor1p étiquetée avec un peptide de poly-histidine à son extrémité 3'-terminale. La figure correspond à la construction de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae*.

De plus, afin d'écarter toute interprétation erronée de résultats qui auraient été uniquement dus à l'insertion du marqueur *KAN^R*, nous avons inactivé le gène *YOR1* dans la souche SUPERYOR (souche obtenue : SUPERYOR Δ yor1). Cette inactivation, qui a consisté à retirer les bases 1751 à 4311 de ce gène, a été effectuée par recombinaison homologue d'un fragment d'ADN de ~1600 pb contenant les bases 1697 à 1750 de *YOR1*, le gène *KAN^R* (avec le promoteur et le terminateur du gène *TEF*) et les bases 4312 à 4365 de *YOR1* (voir *Matériels et méthodes*).

Dans tous les cas, nous avons vérifié par PCR que l'insertion du fragment d'ADN contenant le marqueur *KAN^R* s'était faite au niveau du locus *PDR5*.

Préparations d'extraits de membranes plasmiques

Afin de déterminer s'il y avait effectivement production dans la levure de protéines Yor1p poly-histidylées, des extraits de membranes plasmiques ont été préparés par cassage aux billes de verre de cellules des souches SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀, ainsi que de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1. Après une centrifugation à basse vitesse (2000 g) pour éliminer les cellules intactes et les débris cellulaires, les membranes ont été récupérées par centrifugation à haute vitesse (20000-100000 g). Les expériences décrites dans la partie *Purification des protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀* nous ayant montré que de nombreuses protéines cytoplasmiques étaient toujours présentes dans ces extraits de membranes, nous avons lavé ces membranes avec un tampon contenant 1 M NaCl. Cette étape permet d'éliminer plus de 70 % des protéines contaminantes (figure 21 A). Lorsque l'extrait a été préparé à partir de la souche SUPERYOR-(His)₁₀, nous avons pu constater, par immunodétection avec des anticorps anti RGS-His, que ce lavage n'entraînait pas la perte de Yor1p-(His)₁₀ (figure 21 A).

Comme on peut le voir sur le gel SDS coloré au bleu de Coomassie (figure 21 B), les profils électrophorétiques obtenus pour les 4 souches sont semblables, à l'exception d'une bande de ~170 kDa qui n'existe pas dans l'extrait de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1. Cette bande correspond à la protéine Yor1p. En effet, elle est reconnue par les anticorps anti RGS-His lorsque les protéines sont poly-histidylées (figure 21 B). De plus, l'identité de cette protéine a été confirmée par spectrométrie de masse. La bande de ~170 kDa d'un extrait SUPERYOR-(His)₁₀ a été excisée du gel, digérée par la trypsine et les peptides obtenus ont été analysés par la technique MALDI. Ainsi, 38 peptides tryptiques couvrant 27 % de la séquence de Yor1p-(His)₁₀ ont été générés, ce qui a confirmé que cette bande correspondait bien à Yor1p-(His)₁₀. Les résultats présentés sur la figure 21 B montrent également que les 3 souches SUPERYOR expriment toutes des quantités équivalentes de Yor1p. L'analyse densitométrique du gel coloré au bleu de Coomassie nous a permis d'estimer que Yor1p, poly-histidylée ou non, représentait 8-10 % des protéines totales présentes dans les échantillons.

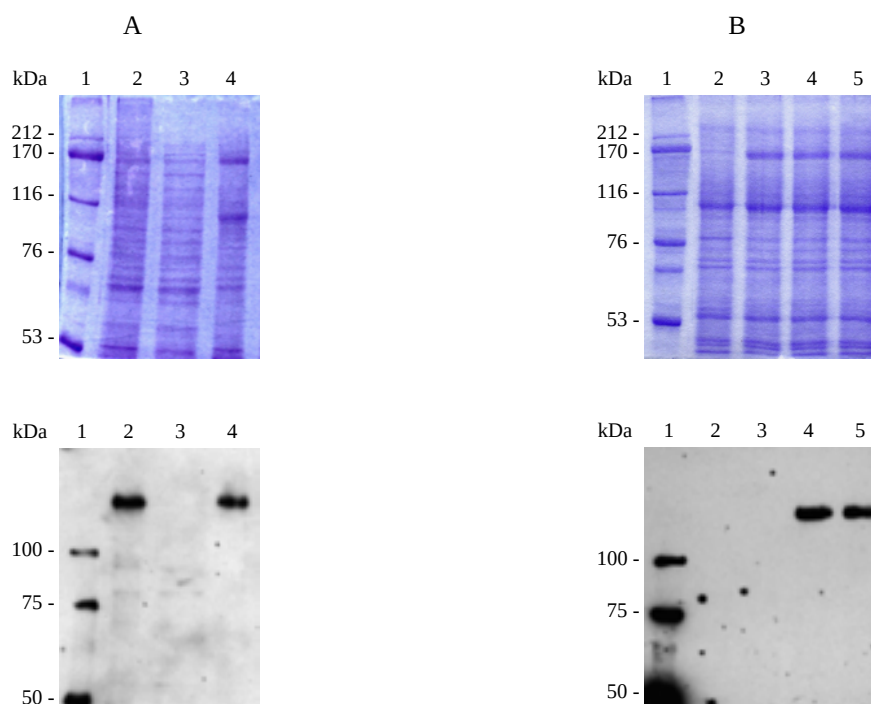


Figure 21. Analyse d'extraits de membrane de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. En haut : protéines colorées au bleu de Coomassie. En bas : immunodétection avec des anticorps anti RGS-His. Les deux gels ont été réalisés en parallèle, avec les mêmes échantillons de protéines membranaires. A. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ (20 µg de protéines). Puits 3 : surnageant obtenu après lavage de l'extrait à 1 M NaCl (12,5 µg de protéines). Puits 4 : culot obtenu après lavage de l'extrait à 1 M NaCl (7,5 µg de protéines). B. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYORΔyor1 (10 µg de protéines). Puits 3 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR (10 µg de protéines). Puits 4 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₆ (10 µg de protéines). Puits 5 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ (10 µg de protéines).

Analyse fonctionnelle *in vivo* des souches produisant les protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀

Pour savoir si les protéines Yor1p poly-histidylées étaient produites sous forme fonctionnelle, nous avons testé la résistance à l'oligomycine et à la rhodamine B des souches produisant Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀. Sur des boîtes contenant des concentrations croissantes d'oligomycine ou de rhodamine B, nous avons comparé la croissance des souches SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ à celle de la souche SUPERYOR (exprimant la

protéine Yor1p non étiquetée) et à celle de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1 (dans laquelle le gène *YOR1* a été inactivé). Nous avons ajouté un autre témoin négatif : la souche AD12345678 (AD1-8) (Decottignies *et al.*, 1998) (qui diffère de SUPERYOR Δ yor1 par l'absence du marqueur *KAN^R* et par l'inactivation du gène *PDR15* codant un transporteur ABC).

Les résultats présentés sur la figure 22 montrent que l'expression de Yor1p à partir du promoteur *PDR5*, sous forme poly-histidylée ou non, permet aux levures de pousser en présence de 100 μ M d'oligomycine ou de 5 mM de rhodamine B, alors que les souches témoin SUPERYOR Δ yor1 et AD1-8 poussent mal avec 0,2 μ M d'oligomycine ou 100 μ M de rhodamine B et ne poussent pratiquement plus avec 0,3 μ M d'oligomycine ou 200 μ M de rhodamine B. Ce résultat suggère que les protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ sont produites sous forme fonctionnelle et sont correctement localisées dans la membrane plasmique.

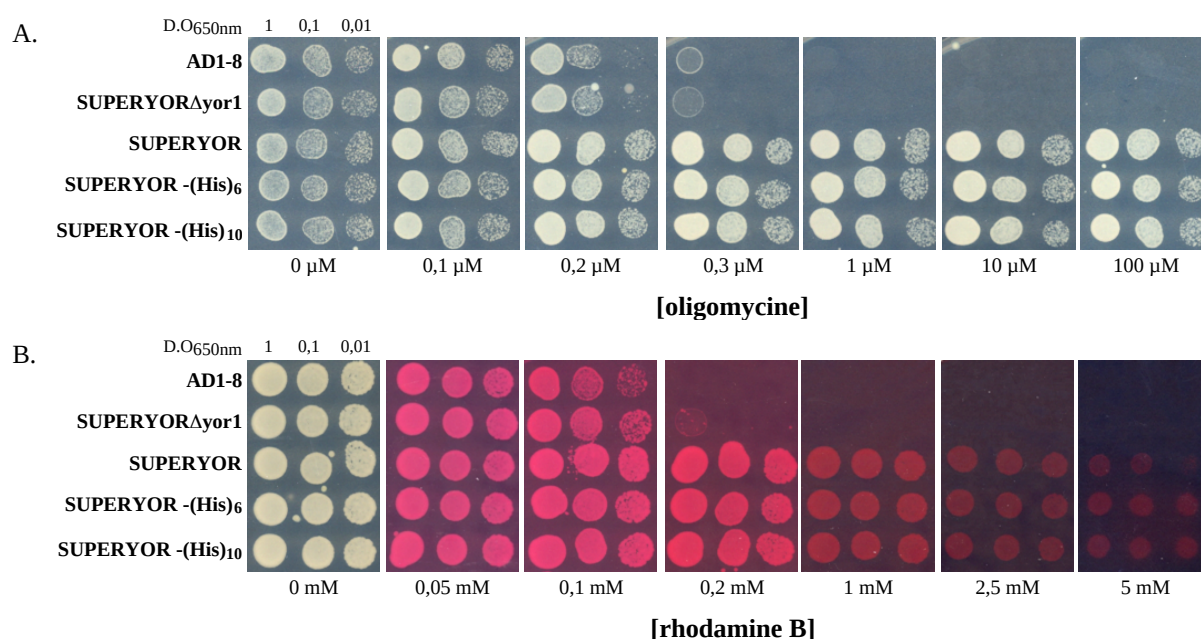


Figure 22. Effet de l'oligomycine (A) et de la rhodamine B (B) sur la croissance des souches AD1-8, SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules ont été cultivées pendant une nuit dans du milieu YPG à 30°C, puis diluées dans de l'eau de façon à obtenir une D.O. finale de 1, 0,1 ou 0,01 à 650 nm. Des gouttes de 5 μ l ont été déposées sur des boîtes de YPGA contenant des concentrations croissantes d'oligomycine ou sur des boîtes de YPGA contenant des concentrations croissantes de rhodamine B. Les boîtes ont été analysées après 2 jours de culture à 30°C.

Transport actif de la rhodamine B

Pour confirmer que les protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ étaient bien fonctionnelles, nous avons étudié le transport de la rhodamine B par ces protéines.

Il a déjà été montré que des cellules intactes de levure surexprimant Yor1p sont capables d'excréter la rhodamine B d'une manière ATP-dépendante (Decottignies *et al.*, 1998). Dans ces expériences, les cellules sont d'abord préincubées avec du 2-désoxy-D-glucose pour inhiber la glycolyse et appauvrir la cellule en ATP, puis chargées avec de la rhodamine B par diffusion passive. On ajoute ensuite du glucose, ce qui alimente la glycolyse et provoque une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP. On suit alors le transport de la rhodamine B vers l'extérieur de la cellule en prélevant des échantillons au cours du temps et en mesurant la fluorescence de la rhodamine B dans les surnageants obtenus après centrifugation de ces échantillons (figure 23).

Nous avons utilisé cette méthode pour comparer l'efficacité du transport de la rhodamine B par les protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀. Des cellules des souches AD1-8, SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ ont été chargées avec des quantités similaires de rhodamine B, ce qui a été démontré en mesurant la fluorescence du culot des cellules. Puis, le transport actif de la rhodamine B a été mesuré. La fluorescence dans les surnageants correspondant aux souches SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ a augmenté rapidement, pour atteindre une valeur stationnaire au bout de ~25 minutes, tandis que la fluorescence dans les surnageants des cellules Δ yor1 (AD1-8, SUPERYOR Δ yor1) est restée faible. Les courbes obtenues avec les cellules exprimant les protéines Yor1p poly-histidylées (SUPERYOR-(His)₆, SUPERYOR-(His)₁₀) sont très semblables à celles observées avec la souche produisant la protéine Yor1p native (SUPERYOR), prouvant ainsi que la présence de l'étiquette de poly-histidine ne modifie pas la vitesse de transport.

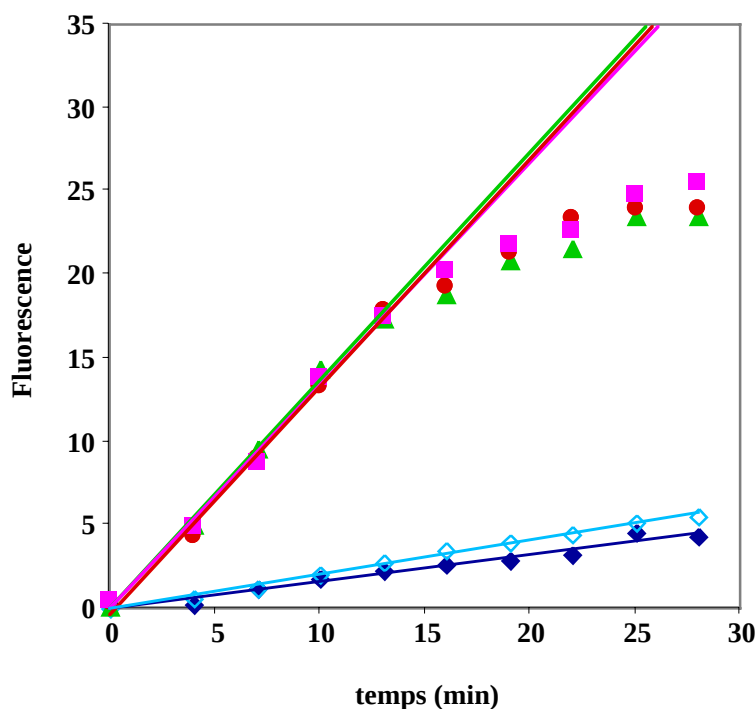


Figure 23. Exportation de la rhodamine B par les souches AD1-8 (◆), SUPERYORΔyor1 (◇), SUPERYOR (▲), SUPERYOR-(His)₆ (●) et SUPERYOR-(His)₁₀ (■) de *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules de levure appauvries en ATP ont été chargées avec de la rhodamine B pendant 2 heures à température ambiante. Après des lavages intensifs pour éliminer la rhodamine B extracellulaire, du glucose a été ajouté à une concentration finale de 200 mM. Aux temps indiqués, des échantillons de 1,2 ml ont été prélevés et centrifugés. Puis, la fluorescence de la rhodamine B présente dans les surnageants a été mesurée.

En s'appuyant sur les résultats des tests de résistance aux produits toxiques, ainsi que sur les mesures du transport actif de la rhodamine B, nous avons conclu que les protéines Yor1p poly-histidylées étaient surproduites et entièrement fonctionnelles *in vivo*.

Analyse phénotypique des souches surproduisant la protéine Yor1p

Par ailleurs, nous avons utilisé les souches que nous avons construites pour préciser l'implication de Yor1p dans la résistance de la levure à différents produits toxiques. En effet, étant donné que les transporteurs ABC ont des spécificités de substrat chevauchantes, il est parfois difficile de mettre en évidence le rôle d'un transporteur particulier, car sa contribution est masquée par celle d'autres transporteurs. Nous avons profité de la surproduction de Yor1p dans un contexte où les gènes de 5 transporteurs ABC majeurs sont inactivés (*PDR5*, *PDR10*, *PDR11*, *SNQ2*, *YCF1*) pour étudier les propriétés de résistance pouvant être attribuées à

Yor1p. Cette étude a été faite en déposant des gouttes de suspension des levures SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ sur des boîtes de YPGA contenant des concentrations croissantes d'un composé donné (en suivant le même protocole que celui décrit dans la légende de la figure 22). Nous avons testé des produits dont la structure ressemble à celle des molécules auxquelles une souche Δ yor1 est sensible (oligomycine, rhodamine B, doxorubicine, tétracycline ou bromure d'éthidium) (figure 24). Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

Quel que soit le composé examiné, la résistance des cellules SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ a toujours été identique à celle de la souche SUPERYOR.

Dans un premier temps, notre étude a permis de confirmer l'implication de Yor1p dans la résistance à la doxorubicine et à la tétracycline. Précédemment, Kolaczowski *et al.* (1998) avaient observé qu'une souche Δ yor1 était plus sensible à la doxorubicine, à la tétracycline et au bromure d'éthidium. Nous avons constaté que, réciproquement, la surexpression de Yor1p conférait une résistance accrue à la doxorubicine et à la tétracycline. Par contre, nous n'observons qu'un effet très faible de la surexpression de Yor1p sur la résistance du bromure d'éthidium.

La surexpression de Yor1p confère une résistance accrue, non seulement à la rhodamine B, mais également aux rhodamines 6G et 101. Dans le cas de ces rhodamines, la concentration inhibitrice de croissance est respectivement augmentée environ 200 et 4 fois lorsque Yor1p est surexprimée (la concentration inhibitrice de croissance (CIC) est définie comme la concentration de produit toxique la plus faible à laquelle les levures ne parviennent plus à pousser). Il avait été montré précédemment que la rhodamine 6G était transportée activement par Pdr5p (Kolaczowski *et al.*, 1996). La protéine Yor1p est donc également impliquée dans la résistance à ce colorant.

De plus, nous avons montré que Yor1p conférait une résistance accrue au verapamil, un modulateur de l'activité de la P-glycoprotéine de mammifère. Nous avons aussi observé un léger effet de la surexpression de Yor1p sur la résistance des levures à l'érythrosine B, à l'éosine Y et au bleu de bromophénol. Aucun effet n'a été observé cependant pour des produits comme la fluorescéine, l'o-phénanthroline, les bleu de Coomassie R ou G, le chloramphénicol ou le Ponceau S.

Nous avons également étudié la participation de Yor1p à la résistance au cadmium. En effet, il avait été suggéré que Yor1p participait à la détoxification de ce métal (Cui *et al.*, 1996). Pour

toutes les souches testées, la CIC du CdCl_2 a été de 30 μM . Ainsi, la surexpression de Yor1p ne confère pas de résistance particulière au cadmium dans le milieu riche YPGA.

Tableau 3. Effet de différents produits toxiques sur la croissance des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules ont été cultivées pendant une nuit dans du milieu YPG à 30°C, puis diluées dans de l'eau de façon à obtenir une D.O. finale de 1, 0,1 ou 0,01 à 650 nm. Des gouttes de 5 μl ont été déposées sur des boîtes de YPGA contenant des concentrations croissantes de produit toxique. Ces concentrations ont été choisies de telle sorte que le rapport entre une concentration et la concentration précédente soit toujours inférieur à 2,5. Les boîtes ont été analysées après 2 jours de culture à 30°C. La concentration inhibitrice de croissance (CIC) est définie comme la concentration de produit toxique la plus faible à laquelle les levures ne parviennent plus à pousser.

	Concentration inhibitrice de croissance	
	SUPERYOR Δ yor1	SUPERYOR
		SUPERYOR-(His) ₆ ou 10
Oligomycine	0,3 μM	> 100 μM
Rhodamine B	200 μM	7,5 mM
Doxorubicine	25 μM	250 μM
Tétracycline	10 mM	> 20 mM
Rhodamine 6G	1 μM	200 μM
Rhodamine 101	0,25 mM	1 mM
Verapamil	0,8 mM	2 mM
Érythrosine B	2 mM	15 mM
Éosine Y	10 mM	20 mM
Bromure d'éthidium (BET)	50 μM	75 μM
Bleu de bromophénol	1 mM	> 4 mM
o-Phénanthroline	75 μM	75 μM
Fluorescéine	30 mM	30 mM
Bleu de Coomassie R	> 0,5 mM	> 0,5 mM
Bleu de Coomassie G	> 0,5 mM	> 0,5 mM
Chloramphénicol	2 mM	2 mM
Ponceau S	> 9 mM	> 9 mM
CdCl_2	30 μM	30 μM

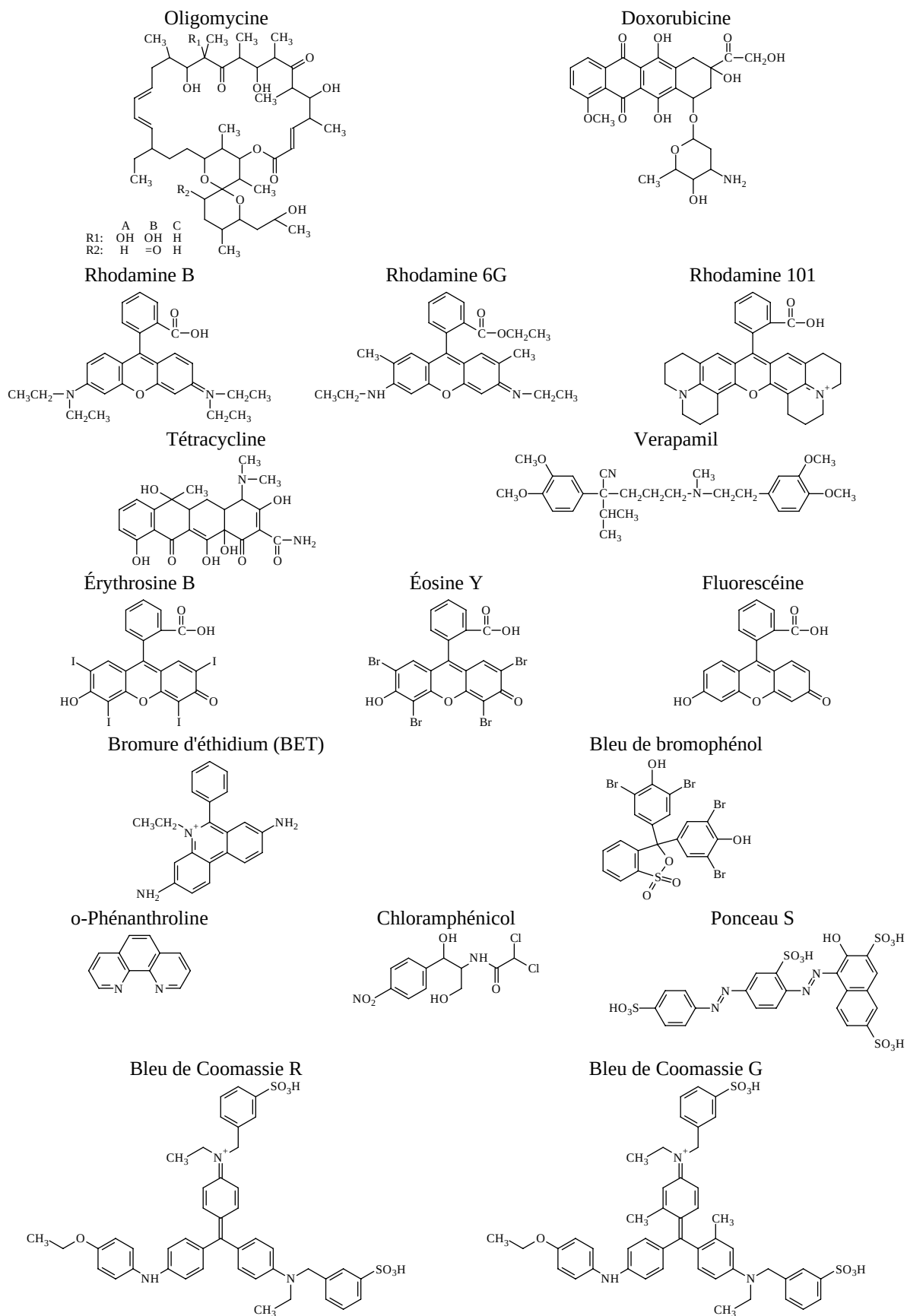


Figure 24. Formules chimiques des produits dont l'effet sur la croissance des levures a été étudié.

Les produits pour lesquels Yor1p augmente la résistance de la levure ont des structures assez différentes les unes des autres. Cui *et al.* ont proposé en 1996 que Yor1p puisse être un transporteur d'anions organiques (Cui *et al.*, 1996). On peut remarquer que, parmi les produits dont Yor1p atténue la toxicité, l'oligomycine, la doxorubicine, le bromure d'éthidium ou la tétracycline ne présentent pas de groupement carboxyle. Ici, nous montrons que Yor1p confère une résistance accrue à d'autres produits non anioniques, comme la rhodamine 6G, le verapamil ou le bleu de bromophénol. De plus, Yor1p ne semble pas impliquée dans la toxicité des composés anioniques comme la fluorescéine, les bleus de Coomassie R ou G ou le Ponceau S.

Ainsi, on peut conclure que Yor1p, comme Pdr5 (Balzi *et al.*, 1987) ou la P-gp (Chen *et al.*, 1986), confère une résistance à une gamme de produits très divers du point de vue structural.

Purification des protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀

Solubilisation des protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ par le *n*-dodécyl-β-D-maltoside et purification de ces protéines par chromatographie d'affinité

La construction des protéines recombinantes Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ a été réalisée pour qu'il soit possible de les purifier par chromatographie d'affinité sur des colonnes greffées avec des ions métalliques. Comme ces protéines sont membranaires, elles doivent être solubilisées avant d'être purifiées. Pour cette étape, le choix du détergent est crucial. En effet, le détergent ne doit pas empêcher la fixation de la protéine sur la colonne. Pour la solubilisation de la protéine Yor1p-(His)₆, nous avons choisi d'utiliser le *n*-dodécyl-β-D-maltoside (DM) qui avait précédemment été utilisé pour solubiliser la protéine Yor1p non étiquetée (Decottignies *et al.*, 1998), ainsi que d'autres protéines de levure comme Pdr5p (Decottignies *et al.*, 1994) ou Snq2p (Decottignies *et al.*, 1995).

Un protocole permettant une solubilisation complète de nos protéines recombinantes à partir d'un extrait brut de membranes plasmiques a été recherché en effectuant des essais systématiques de conditions de solubilisation. Les expériences réalisées ont montré que la solubilisation de Yor1p-(His)₆ dépendait des concentrations en protéines et en détergent dans le mélange de solubilisation, de la force ionique et de la température à laquelle s'effectuait la solubilisation. Ces essais ont permis de trouver de bonnes conditions de solubilisation :

incubation pendant 1 heure à 4°C de la solution de membranes diluée à 1 mg de protéines par ml, en présence de 0,25 % de DM et de 0,1 M de NaCl.

Nous avons ensuite essayé de purifier la protéine Yor1p-(His)₆, solubilisée dans ces conditions, par chromatographie d'affinité sur une colonne greffée avec des ions métalliques. Mais, la fixation de Yor1p-(His)₆ sur la résine s'est avérée aléatoire : certains échantillons de Yor1p-(His)₆ se sont bien accrochés à la résine tandis que d'autres n'ont pas été retenus.

Cette observation nous a incités à renforcer l'affinité de la protéine pour la résine en ajoutant 4 résidus supplémentaires d'histidine à l'extrémité C-terminale de la protéine Yor1p-(His)₆. Ces 4 résidus n'ont pas changé les propriétés de solubilisation de la protéine, mais ils ont supprimé le caractère aléatoire de la fixation de cette protéine sur la résine.

Les résultats présentés sur la figure 25 montre que Yor1p-(His)₁₀ se fixe sur la résine à une concentration en imidazole de 10 mM et est décrochée par une concentration de 100 mM d'imidazole. Le protocole finalement adopté pour la purification de la protéine Yor1p-(His)₁₀ est le suivant : 16 heures de contact entre le surnageant de solubilisation et la résine Co-Sepharose CL-6B (TALON) en présence de 10 mM d'imidazole (pour réduire la fixation non spécifique d'autres protéines sur la résine), puis lavage avec dix volumes de colonne d'un tampon contenant 20 mM d'imidazole (pour éliminer certaines protéines contaminantes) et, enfin, élution à 100 mM d'imidazole. Ce protocole nous a permis de purifier efficacement la protéine Yor1p-(His)₁₀, mais ne nous a pas permis d'obtenir une protéine homogène. Sur un gel coloré au bleu de Coomassie, on peut observer, dans l'éluat de la colonne, la présence d'une bande intense d'approximativement 170 kDa, reconnue par les anticorps anti RGS-His, ainsi que la présence de plusieurs autres bandes. Deux de ces bandes correspondent à des tailles supérieures à celle de Yor1p et sont immunoréactives, ce qui suggère qu'elles pourraient provenir d'états oligomériques de Yor1p-(His)₁₀. Cette supposition a été confirmée par l'analyse par spectrométrie de masse des peptides tryptiques de ces bandes après leur excision du gel. La bande de 170 kDa a produit 56 peptides couvrant 33 % de la séquence de Yor1p-(His)₁₀. La bande ayant un poids moléculaire apparent approchant celui d'un homodimère a généré 27 peptides représentant 23 % de la séquence de Yor1p-(His)₁₀. Enfin, l'espèce de très haut poids moléculaire a généré 18 peptides couvrant 17 % de la séquence de Yor1p-(His)₁₀.

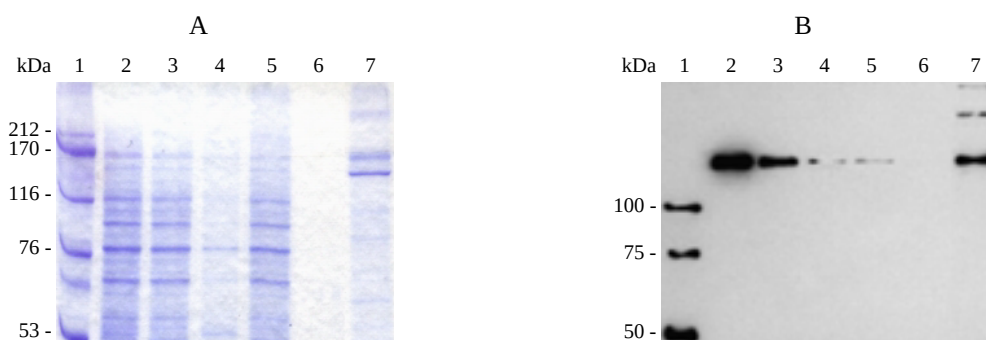


Figure 25. Purification de YOR1-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺, à partir d'un extrait brut des protéines membranaires. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 : extrait brut de protéines membranaires (20 µg de protéines). Puits 3 : surnageant obtenu après solubilisation et centrifugation de l'extrait. Puits 4 : culot obtenu après solubilisation et centrifugation de l'extrait. Puits 5 : protéines non retenue sur la colonne de Co²⁺. Puits 6 : lavage à 20 mM d'imidazole. Puits 7 : élution à 100 mM d'imidazole (3 µg de protéines). A. protéines colorées au bleu de Coomassie. B. immunodétection avec des anticorps anti RGS-His. Les deux gels ont été réalisés en parallèle, avec les mêmes échantillons de protéines membranaires.

Nous avons essayé d'améliorer la pureté de Yor1p-(His)₁₀ en effectuant une purification supplémentaire sur colonne. Ainsi, l'échantillon issu de la colonne de Co²⁺ a été appliqué sur une colonne échangeuse d'ions (DEAE Sephacel) ou sur une colonne greffée avec du nickel (Ni-NTA Agarose). Nous avons ainsi réussi à améliorer la pureté de Yor1p-(His)₁₀, mais le rendement de ces purifications a été faible. Nous avons alors décidé d'identifier les protéines contaminantes par spectrométrie de masse. Les bandes correspondantes ont été excisées du gel, digérées par la trypsine, et les peptides obtenus ont été analysés par la technique MALDI. Cela nous a montré que les contaminants majeurs étaient deux protéines cytoplasmiques : EF-1 alpha (50 kDa) et Clu1p (145 kDa). Pour les éliminer, nous avons lavé les membranes dans un tampon contenant 1 M NaCl. Cette étape a permis l'élimination de plus de 70 % des protéines présentes dans les extraits membranaires bruts.

Les résultats présentés sur la figure 26 montrent que le lavage des membranes à 1 M NaCl permet effectivement l'élimination des protéines contaminantes visibles sur la figure 25. La pureté de Yor1p-(His)₁₀, basée sur les trois polypeptides reconnues par les anticorps anti RGS-His, a été estimée à 85 % après analyse densitométrique du gel coloré au bleu de Coomassie.

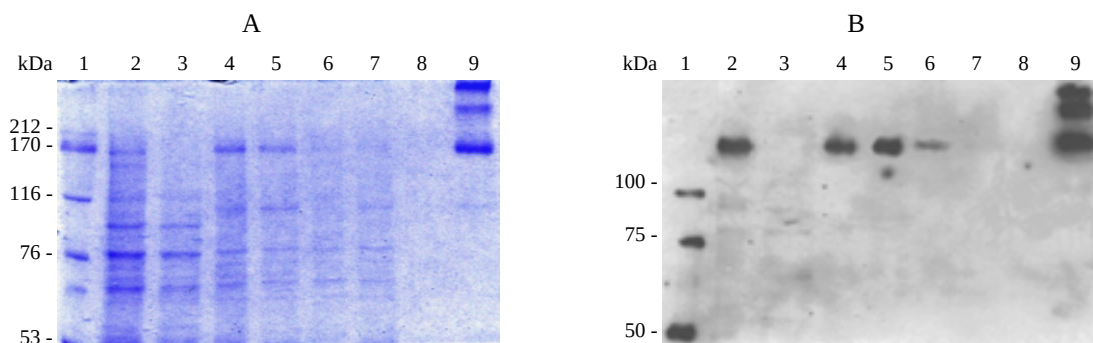


Figure 26. Purification de YOR1-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺, à partir d'un extrait des protéines membranaires. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 : extrait brut de protéines membranaires (20 µg de protéines). Puits 3 : surnageant obtenu après lavage de l'extrait brut à 1 M NaCl. Puits 4 : culot obtenu après lavage de l'extrait brut à 1 M NaCl. Puits 5 : surnageant obtenu après solubilisation et centrifugation de l'extrait lavé. Puits 6 : culot obtenu après solubilisation et centrifugation de l'extrait. Puits 7 : protéines non retenues sur la colonne de Co²⁺. Puits 8 : lavage à 20 mM d'imidazole. Puits 9 : élution à 100 mM d'imidazole (3 µg de protéines). A. protéines colorées au bleu de Coomassie. B. immunodétection avec des anticorps anti RGS-His. Les deux gels ont été réalisés en parallèle, avec les mêmes échantillons de protéines membranaires.

Ce procédé permet la purification d'environ 300 µg de Yor1p-(His)₁₀ à partir d'un litre de culture.

Caractérisation de la protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée

Activité ATPasique

Nous avons ensuite voulu savoir si la protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée était fonctionnelle et, en particulier, si elle possédait une activité ATPasique. Dans le cas d'autres protéines ABC, la mise en évidence d'une telle activité a été effectuée soit sur la protéine solubilisée par un détergent, soit sur la protéine reconstituée dans des protéoliposomes (Ambudkar *et al.*, 1992, Lerner-Marmarosh *et al.*, 1999). Pour explorer ces deux conditions, nous avons cherché à insérer la protéine Yor1p-(His)₁₀ dans des protéoliposomes. Pour cela, nous avons ajouté à la protéine purifiée des lipides d'*Escherichia coli*, de jaune d'oeuf, de soja ou de *Saccharomyces cerevisiae*, à raison de 50 mg de lipides par mg de protéine. Après une incubation de 20 minutes à 14°C, le détergent a été enlevé par l'addition de Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) suivie par une incubation pendant 3 heures à 4°C. Ce protocole a permis d'obtenir 50 à 70 %

de Yor1p-(His)₁₀ sous une forme pouvant être récupérée par centrifugation et donc vraisemblablement associée à des liposomes.

Nous avons alors dosé l'activité ATPasique des échantillons de Yor1p-(His)₁₀ aussi bien avant qu'après la reconstitution dans des protéoliposomes. Les mesures ont été effectuées à 37°C, dans un mélange réactionnel contenant 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 µM d'ATP, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mg /ml de BSA, 0,2 mM de DTT et 2 % de glycérol. Nous avons choisi un pH égal à 7,5 car, précédemment, Decottignies *et al.* (1998) avaient mis en évidence une faible activité de Yor1p, optimale à ce pH, après une solubilisation de la protéine par du *n*-dodécyl-β-D-maltoside et une purification partielle par ultracentrifugation sur un gradient de sucrose. Lorsque les dosages ont été effectués avec de la protéine solubilisée, l'échantillon de protéines a apporté avec lui 0,005 % de DM dans le mélange réactionnel, tandis que la protéine reconstituée dans des protéoliposomes a apporté 0,4 mg /ml de lipides. Dans tous les cas (protéine solubilisée ou protéine reconstituée avec des lipides d'*Escherichia coli*, de jaune d'œuf, de soja ou de *Saccharomyces cerevisiae*), nous avons obtenu une activité ATPasique comprise entre 3 et 4 nmol /min /mg de protéines. Cette activité est inhibée par de faibles concentrations d'EDTA (1 µM) ou d'autres chélatants des métaux (*o*-phénanthroline, NTA). En revanche, elle est stimulée par la présence d'ions Zn²⁺ ou Co²⁺. Elle est inhibée par le vanadate et insensible à d'autres inhibiteurs d'ATPases comme l'azide ou le pCMPS. Elle est également insensible à l'addition de substrats potentiels de Yor1p (oligomycine, rhodamines B et 6G, doxorubicine et verapamil).

Afin de déterminer si cette activité ATPasique était due à la protéine Yor1p-(His)₁₀, nous avons réalisé une expérience de purification à partir d'un extrait de membranes plasmiques de la souche SUPERYOR. Dans cette souche, la protéine Yor1p n'est pas étiquetée avec un peptide de poly-histidine et une analyse par électrophorèse nous a montré qu'effectivement, cette protéine n'était pas retenue sur une colonne de Co²⁺. Néanmoins, l'échantillon provenant de l'élution de la colonne à 100 mM d'imidazole possédait une activité ATPasique semblable à celle des échantillons contenant la protéine Yor1p-(His)₁₀. Nous en avons conclu qu'une protéine co-purifiée avec Yor1p-(His)₁₀ était responsable de la majeure partie de cette activité et que, par contre, dans nos conditions, l'activité ATPasique de la protéines Yor1p-(His)₁₀ purifiée était vraisemblablement inférieure à 0,5 nmol /min /mg (c'est-à-dire inférieure à 0,0014 s⁻¹).

Analyse de l'état d'oligomérisation de la protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée

Comme nous l'avons vu ci-dessus, l'analyse par électrophorèse et spectrométrie de masse des échantillons de Yor1p-(His)₁₀ purifiés met en évidence la présence d'oligomères de cette protéine.

Nous avons cherché à savoir si les trois polypeptides visibles sur les gels SDS et reconnus par les anticorps anti RGS-His pré-existaient en solution ou si leur apparition était une conséquence de l'électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes.

Nous avons tout d'abord observé que les intensités relatives des trois bandes changeaient en fonction de la température à laquelle l'échantillon était traité avant d'être déposé sur le gel. Comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*, pour dénaturer les échantillons de protéines membranaires, nous les avons généralement chauffés pendant 15 min à 37°C dans du tampon Laemmli (6,25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 5 % glycérol, 200 mM 2-mercaptoéthanol, 0,5 mg /ml de bleu de bromophénol) avant application sur le gel. La température de 37°C a été choisie car, dans le cas de certaines protéines membranaires, elle permet d'éviter la formation d'agrégats (Sagne *et al.*, 1996, Manley *et al.*, 2000, Bullis *et al.*, 2002). Quand nous avons traité les échantillons à 95°C au lieu de 37°C, les proportions des espèces de haut poids moléculaire ont été plus importantes (figure 27). Nous avons ensuite essayé de réduire les proportions des espèces de haut poids moléculaire en conservant une température de dénaturation de 37°C, mais en modifiant la préparation des échantillons avant l'application sur gel. Les résultats présentés sur la figure 27 montrent que ni l'addition de fortes concentrations de 2-mercaptoéthanol (2-ME) ou de SDS, ni l'addition de DTT, d'EDTA ou d'urée n'empêchent la formation d'espèces de haut poids moléculaire. Ceci suggère que Yor1p est soumis à des interactions protéine-protéine extrêmement fortes, non dissociées complètement par le SDS, et semblables à celles qui ont été décrites dans le cas de la protéine GF (*glycerol facilitator*) d'*Escherichia coli* (Manley *et al.*, 2000). Il semble donc vraisemblable que la protéine soit agrégée dès la sortie de la colonne de Co²⁺.

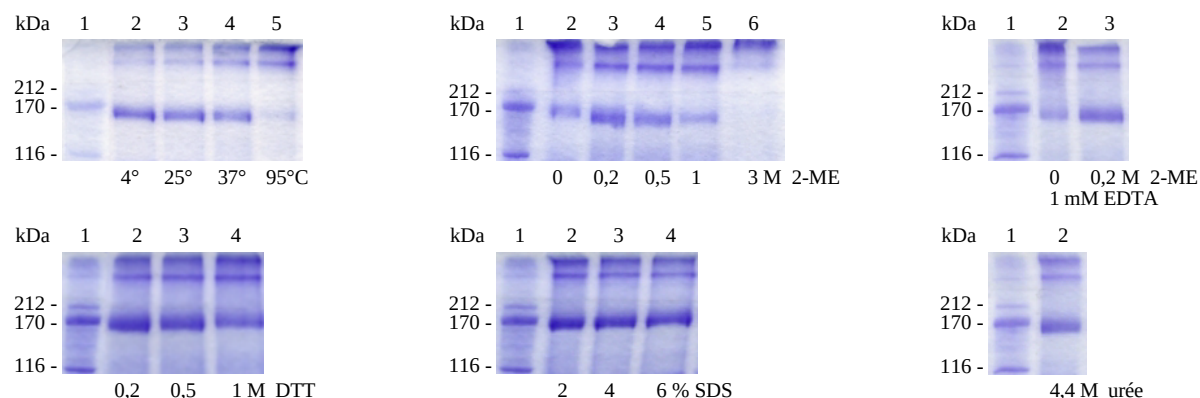


Figure 27. Analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide dénaturants d'échantillons de Yor1p-(His)₁₀ traités de différentes façons avant d'être appliqués sur gel. 3 µg de Yor1p-(His)₁₀ purifiée ont été dilués dans 6,25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5 % glycérol, 0,5 mg/ml bleu de bromophénol, 0,2 M 2-mercaptoéthanol (2-ME) et 2 % SDS, sauf indications contraires indiquées en bas des gels. Le DTT, l'EDTA et l'urée ont été ajoutés aux concentrations indiquées. Les échantillons ont été incubés pendant 15 min à 37°C, sauf dans le cas du gel présenté en haut à gauche (15 min à 4°C, 15 min à 25°C ou 2 min à 95°C). Après l'électrophorèse, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie.

L'agrégation de la protéine Yor1p-(His)₁₀ dès la sortie de la colonne de Co²⁺ a été confirmée par des analyses sur gels natifs ou par filtration HPLC sur une colonne de TSK G4000SW_{XL}. Sur un gel natif, Yor1p-(His)₁₀ purifiée migre sous forme d'une bande dont la taille est plus grande que celle de la thyroglobuline (669 kDa). À la sortie de la colonne de TSK G4000SW_{XL} la protéine est indétectable, vraisemblablement parce qu'elle est retenue sur la pré-colonne du système HPLC à cause de son agrégation.

Ces expériences suggèrent donc que la protéine est agrégée à la sortie de la colonne de Co²⁺. Les agrégats formés ne sont pas dissociés à 100 % lors de l'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Essais d'amélioration de l'état de la protéine après la purification

Solubilisation et purification en présence d'autres détergents

Afin de tenter de limiter l'agrégation de la protéine Yor1p-(His)₁₀ issue de la purification sur la colonne de Co²⁺, nous avons changé la nature ou la concentration du détergent utilisé lors de l'élution de la colonne. L'extrait de membranes plasmiques a été solubilisé par le *n*-dodécyl-β-D-maltoside (DM) et la protéine Yor1p-(His)₁₀ a été fixée sur la colonne de Co²⁺ en

présence de 0,25 % de DM. Ensuite, pour changer le détergent, la colonne a d'abord été lavée avec 20 volumes de colonne d'un tampon contenant 10 mM d'imidazole et le nouveau détergent, puis éluée avec un tampon contenant 100 mM d'imidazole et ce même détergent. Les résultats présentés sur la figure 28 montrent qu'aucune des conditions testées n'a empêché l'agrégation de la protéine. De plus, avec des détergents comme le SDS, le LS (*n*-lauroyl-sarcosine) ou le LPG (lysophosphatidylglycérol, 1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycéro-3-[phospho-*rac*-(1-glycérol)]), la quantité de Yor1p-(His)₁₀ récupérée à la sortie de la colonne devenait plus faible que celle récupérée dans les conditions initialement mises au point (0,1 % DM). Une possibilité est que ces détergents décrochent la protéine Yor1p-(His)₁₀ lors de l'étape de lavage.

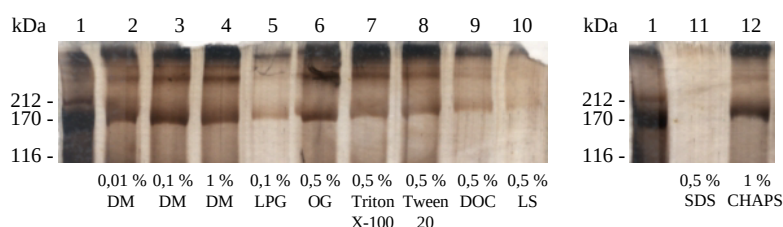


Figure 28. Purification de Yor1p-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺ à partir d'un extrait des protéines membranaires solubilisé par le DM. Les échantillons provenant de l'élution de la colonne de Co²⁺ dans différentes conditions ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Après l'électrophorèse, les protéines ont été colorées à l'argent. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 à 12 : élution à 100 mM d'imidazole en présence de *n*-dodécyl-β-D-maltoside (DM) à 0,01 % (puits 2), 0,1 % (puits 3) ou 1 % (puits 4), de lysophosphatidylglycérol (LPG) à 0,1 % (puits 5), de *n*-octyl-β-D-glucopyranoside (OG) à 0,5 % (puits 6), de Triton X-100 à 0,5 % (puits 7), de Tween 20 à 0,5 % (puits 8), de désoxycholate (DOC) à 0,5 % (puits 9), de *n*-lauroyl-sarcosine (LS) à 0,5 % (puits 10), de SDS à 0,5 % (puits 11) ou de CHAPS à 1 % (puits 12).

Parmi les détergents testés, à part le DM, l'OG (*n*-octyl-β-D-glucopyranoside), le Triton X-100, le Tween 20, le DOC (désoxycholate) et le CHAPS permettent à la protéine Yor1p-(His)₁₀ de rester accrochée sur la colonne de Co²⁺. Nous avons alors essayé de solubiliser directement l'extrait des membranes plasmiques par ces détergents. En utilisant le Triton X-100 ou le DOC, nous sommes arrivés à solubiliser ~25 % de la protéine Yor1p-(His)₁₀ présente dans l'extrait de membranes plasmiques, alors que le Tween 20 ou le CHAPS ont été complètement inefficaces. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'OG qui a permis de solubiliser ~50 % de la protéine. Cependant, lorsqu'on utilise l'OG pour solubiliser la protéine, on ne retrouve que des traces de Yor1p-(His)₁₀ dans l'éluat de la colonne de Co²⁺.

Solubilisation et purification en présence des lipides

Les expériences de solubilisation et de purification de Yor1p-(His)₁₀ ne nous ayant pas permis de trouver un meilleur détergent que le DM, nous avons essayé d'améliorer la purification en présence de ce détergent.

La préservation de certaines protéines membranaires dans un état fonctionnel s'est parfois avérée dépendante de la présence constante de lipides au cours de la purification. C'est le cas, par exemple, de la Na⁺K⁺-ATPase de porc (Cohen *et al.*, 2005). Par ailleurs, plusieurs protéines ABC ont déjà été purifiées avec succès en présence de lipides (par exemple, ABCR (Sun *et al.*, 1999), MRP2 (Hagmann *et al.*, 1999) ou P-gp (Urbatsch *et al.*, 1994)).

Par conséquent, nous avons cherché à savoir si, en purifiant la protéine Yor1p-(His)₁₀ en présence de lipides, on pouvait diminuer les proportions des espèces de haut poids moléculaire sur gel SDS. Après solubilisation de Yor1p-(His)₁₀ par le DM et séparation par centrifugation des protéines insolubles, des lipides d'*Escherichia coli* ont été ajoutés au mélange de solubilisation avant que celui-ci ne soit mis en contact avec la résine greffée avec des ions Co²⁺. Des lipides ont été également ajoutés dans les tampons de lavage et d'élution.

Les résultats présentés sur la figure 29 montrent que la présence de ces lipides provoque une nette diminution des formes de haut poids moléculaire de Yor1p-(His)₁₀ visibles sur les gels SDS. Cette diminution est presque totale si les lipides sont présents à une concentration de 4 mg /ml aussi bien pendant l'incubation avec la résine que lors de l'élution de la colonne. Par contre, le rendement de la purification est diminué. Nous n'obtenons que 90 µg de protéine purifiée par litre de culture.

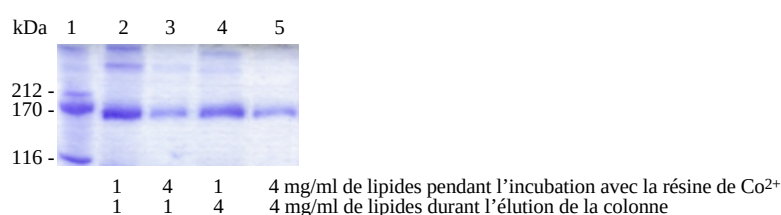


Figure 29. Purification de Yor1p-(His)₁₀ par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co²⁺ en présence de lipides d'*Escherichia coli*. Après l'électrophorèse, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 à 5 : éluions à 100 mM d'imidazole. Les concentrations de lipides présentes pendant l'incubation avec la résine et pendant l'élution sont indiquées en bas du gel.

Malgré cette amélioration de l'état de la protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée, son activité ATPasique est restée faible. Pour mesurer cette activité, l'éluat de la colonne de Co²⁺ a été mis

en contact avec des Bio-Beads pour enlever le détergent, puis dosé à 37°C dans un mélange réactionnel contenant 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 μ M d'ATP, 2 mM de MgCl₂, 100 μ M d'EDTA, 4 mM de NaN₃, 0,2 mM de DTT, 2 % de glycérol, ainsi que de 0,8 mg /ml de lipides d'*Escherichia coli* apportés avec la protéine. Une activité d'environ 3 nmol /min /mg a été détectée. Cette activité est inhibée à 50 % par 100 μ M de vanadate. Les substrats potentiels de Yor1p, comme l'oligomycine ou la rhodamine B, ne stimulent pas cette activité. La rhodamine B, jusqu'à une concentration de 100 μ M, n'a aucun effet, alors que l'oligomycine a un léger effet inhibiteur (25 % d'inhibition à 100 μ M). Nous ne pouvons donc pas attribuer avec certitude l'activité mesurée à Yor1p.

Activité des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ dans des extraits de membranes plasmiques

Marquage par le 8-azido-[α -³²P]ATP

N'observant pas de stimulation de l'activité ATPasique de Yor1p par ses substrats potentiels, nous nous sommes demandé ce qu'il en était avant la solubilisation de la protéine. Nous avons donc cherché à doser l'activité de Yor1p dans des extraits de membranes plasmiques.

Dans un premier temps, pour vérifier l'intégrité de la protéine Yor1p dans des extraits membranaires, nous avons examiné l'interaction des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ avec le 8-azido-ATP, un dérivé photo-activable de l'ATP. Si on expose ce dérivé à un rayonnement UV, il est capable de se fixer covalamment à la protéine grâce au groupement azido. Après une incubation des membranes dans des conditions où l'ATP n'est pas hydrolysé (4°C), à pH 7,5 (comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*), le mélange a été irradié pendant 10 secondes, puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie pour évaluer la quantité de protéines déposée dans chaque puits et ensuite séchés. En utilisant du 8-azido-[α -³²P]ATP, on peut mettre en évidence par autoradiographie la fixation covalente de ce composé sur Yor1p.

Les résultats présentés sur la figure 30 A montrent qu'un marquage identique est obtenu avec les protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ ou Yor1p-(His)₁₀. Par contre, aucun marquage n'a été observé à la hauteur de la bande de Yor1p lorsqu'un extrait de membranes plasmiques de la souche SUPERYOR Δ yor1 a été utilisé. La fixation du 8-azido-ATP sur Yor1p est stimulée

par la présence d'ions Mg^{2+} et inhibée par l'ATP (figure 30 B). Ainsi, l'ATP est capable, avant irradiation, de déplacer le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP préalablement fixé sur Yor1p-(His)₁₀ (figure 30 C).

Nous pouvons donc conclure de ces expériences que la protéine Yor1p présente dans les extraits de membranes plasmiques peut être marquée spécifiquement par le 8-azido-ATP.

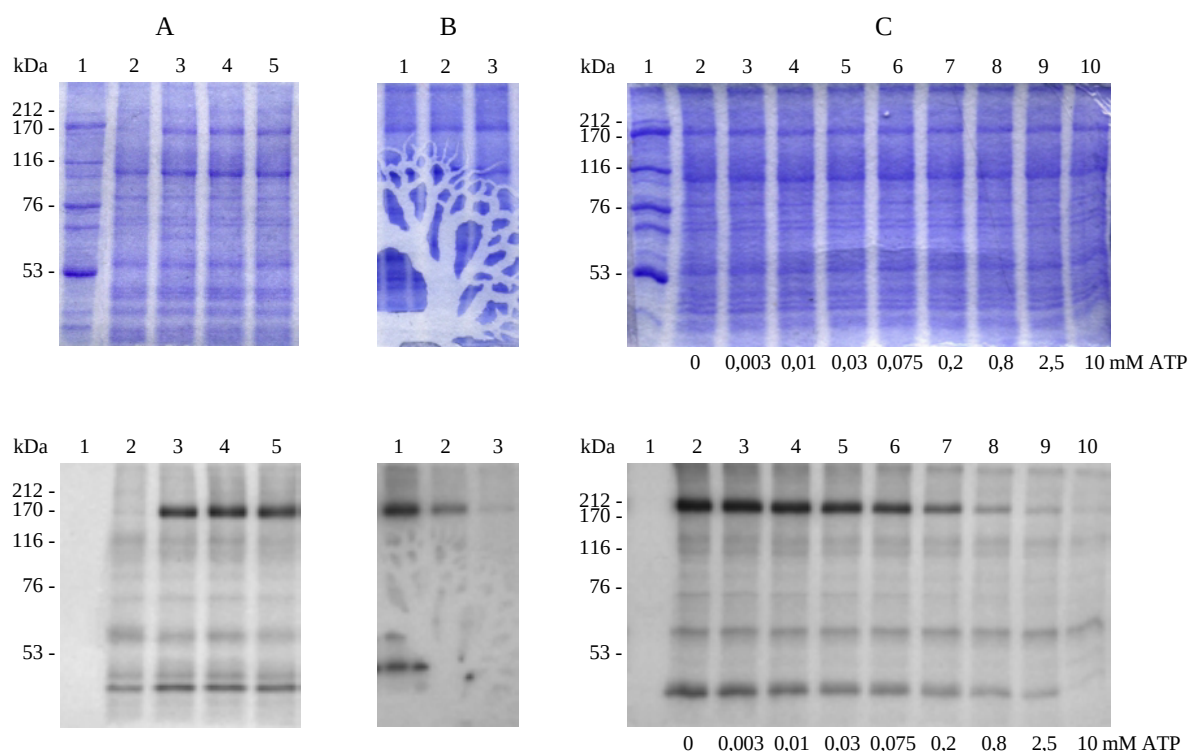


Figure 30. Marquage par le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. En haut : protéines colorées au bleu de Coomassie. En bas : autoradiographie. Tous les marquages ont été effectués sur 10 μ g de protéines membranaires avec 5 μ M de 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP, à 4°C, dans un volume final de 20 μ l, en présence de 2 mM de $MgCl_2$ (sauf indications contraires), comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. L'intégralité du mélange de marquage a été déposée sur le gel. A. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire. Puits 2 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR Δ yor1. Puits 3 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR. Puits 4 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₆. Puits 5 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀. B. Puits 1 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ + 2 mM $MgCl_2$. Puits 2 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ sans $MgCl_2$. Puits 3 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ + 2 mM $MgCl_2$ + 10 mM ATP (l'ATP était présent du début de l'incubation). C. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire. Puits 2 à 9 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ + concentrations croissantes d'ATP (de 0 à 10 mM) (l'ATP a été ajouté après 10 min d'incubation avec le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP et l'incubation a été continuée pendant 10 min).

Mesure de l'activité ATPasique

Pour mettre en évidence l'activité spécifique de Yor1p dans des extraits de membranes plasmiques, nous avons utilisé des extraits lavés à 1 M NaCl. Pour réduire au minimum les activités contaminantes nous avons ajouté, lors du dosage, des inhibiteurs spécifiques de phosphatases et d'ATPases vacuolaires et mitochondriales (molybdate d'ammonium, nitrate de potassium, azide de sodium), comme cela avait déjà été décrit dans la littérature pour d'autres protéines ABC de levure (Nakamura *et al.*, 2001).

L'activité ATPasique a été mesurée en utilisant du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. La libération du $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ a été suivie à 37°C, à pH 7,5, en présence de 10 μM d'ATP, de 2 mM de MgCl_2 , de 0,2 mM de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, de 50 mM de KNO_3 , de 5 mM de NaN_3 , de 10 μM d'EDTA, de 0,2 mM de DTT et de 2 % de glycérol, comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Dans ces conditions, quelle que soit la souche utilisée pour préparer les extraits membranaires (SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ ou SUPERYOR-(His)₁₀), la quantité de phosphate libéré a augmenté linéairement avec le temps. Par ailleurs, quand les membranes ont été omises, l'hydrolyse de l'ATP a été inférieure à 0,1 pmol /min (figure 31).

Nous avons déduit de ces expériences que les membranes extraites de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1 hydrolysent l'ATP à une vitesse de $4,8 \pm 0,5$ nmol par minute et par mg de protéines. Les extraits des souches SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ ont des activités ATPasiques plus élevées : $6,6 \pm 0,6$ nmol /min /mg protéines pour la souche SUPERYOR, $6,8 \pm 0,5$ nmol /min /mg protéines pour la souche SUPERYOR-(His)₆ et $7,2 \pm 0,2$ nmol /min /mg protéines pour la souche SUPERYOR-(His)₁₀. Si on suppose que les différences entre ces activités et celle de l'extrait de SUPERYOR Δ yor1 sont dues à Yor1p, cette protéine serait donc responsable de ~30 % de l'activité mesurée dans les extraits des souches SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀. Si on tient également compte du fait que Yor1p représente, selon nos estimations, ~10 % des protéines totales, on peut en déduire que les protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ ont des activités spécifiques de 18, 20 et 24 nmol /min /mg protéines respectivement, ou encore de $0,05 \text{ s}^{-1}$, $0,055 \text{ s}^{-1}$ et $0,066 \text{ s}^{-1}$.

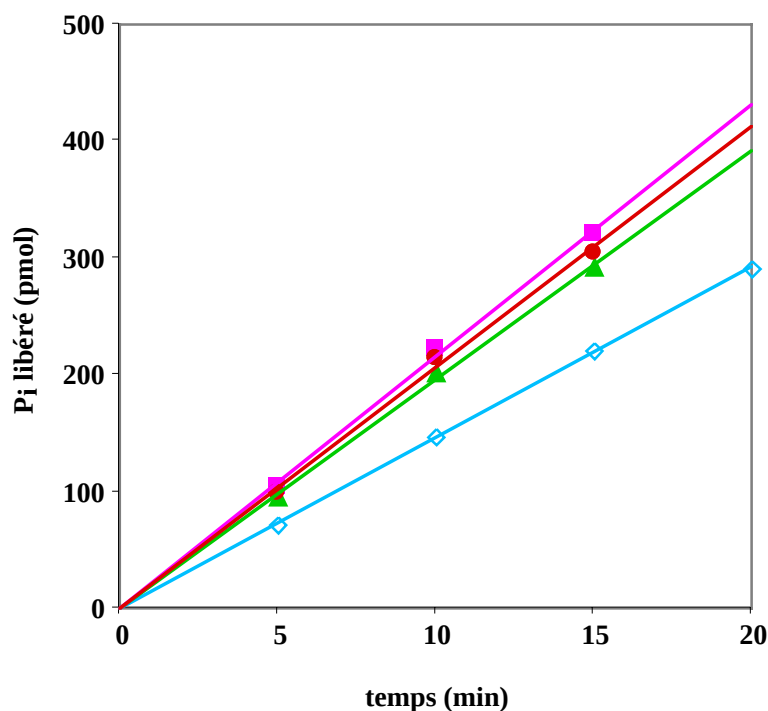


Figure 31. Activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches SUPERYOR Δ yor1 (◇), SUPERYOR (▲), SUPERYOR-(His)₆ (●) et SUPERYOR-(His)₁₀ (■) de *Saccharomyces cerevisiae*. L'hydrolyse de l'ATP a été suivie au cours du temps, à 37°C, dans 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, en présence de 10 μ M [γ -³²P]ATP (200 Ci/mol), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 50 mM KNO₃, 5 mM NaN₃, 10 μ M EDTA, 0,2 mM DTT, 2 % glycérol et 30 μ g/ml de protéines membranaires.

Pour confirmer que Yor1p était bien à l'origine d'une partie de l'activité ATPasique mesurée dans les extraits des souches SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀, nous avons étudié l'effet de divers composés sur cette activité ATPasique (tableau 4). Les réactifs des thiols, *p*-chloro-mercuriphényl sulfonate (pCMPS) (jusqu'à 200 μ M) ou *N*-éthylemaléimide (jusqu'à 2 mM), n'inhibent pas significativement l'activité ATPasique des membranes des souches SUPERYOR, ni celle des membranes de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1. La ouabaïne (1 mM), le *N,N'*-di-cyclohexyl-carbodiimide (DCC) (100 μ M), un inhibiteur de la F-ATPase, ou l'héparine (1 mg/ml), un inhibiteur de kinases, n'ont, également, aucun effet sur les activités ATPasiques des différentes souches. Ces résultats indiquent que l'hydrolyse de l'ATP mesurée avec ces souches n'est pas réalisée par ces ATPases.

Tableau 4. L'effet des divers composés sur l'activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae*. L'activité ATPasique a été mesurée à 37°C pendant 15 min dans 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, en présence de 10 μ M [γ -³²P]ATP (200 Ci/mol), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 50 mM KNO₃, 5 mM NaN₃, 10 μ M EDTA, 0,2 mM DTT, 2 % glycérol, 30 μ g /ml de protéines membranaires. La concentration utilisée pour chacun des composés étudiés est indiquée dans le tableau.

	Activité ATPasique (%)	
	SUPERYOR Δ yor1	SUPERYOR
sans inhibiteur	100	100
pCMPS, 200 μ M	88 $\pm$ 3	84 $\pm$ 2
NEM, 2 mM	77 $\pm$ 5	76 $\pm$ 3
Ouabaine, 1 mM	96 $\pm$ 3	99 $\pm$ 4
DCC, 100 μ M	97 $\pm$ 6	91 $\pm$ 2
Héparine, 1 mg /ml	94 $\pm$ 1	89 $\pm$ 2
Vanadate, 200 μ M	45 $\pm$ 3	30 $\pm$ 5

Par contre, le vanadate, un inhibiteur spécifique de P-ATPases et des protéines ABC, a inhibé aussi bien l'activité ATPasique des membranes préparées à partir de la souche témoin, que celle des membranes préparées à partir des souches produisant Yor1p (tableau 4). La figure 32 présente la différence, en fonction du vanadate, entre les activités des membranes de ces souches et celle de membranes de la souche témoin. On voit que cette différence décroît rapidement quand la concentration en vanadate augmente, avec un demi-effet obtenu pour une concentration de vanadate de ~ 20 μ M. Ces résultats sont compatibles avec l'idée que la protéine Yor1p est bien à l'origine du supplément d'activité observé dans les extraits des souches où cette protéine est exprimée. Ils suggèrent également que l'activité des membranes de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1 est partiellement due à des P-ATPases ou à d'autres protéines ABC que Yor1p.

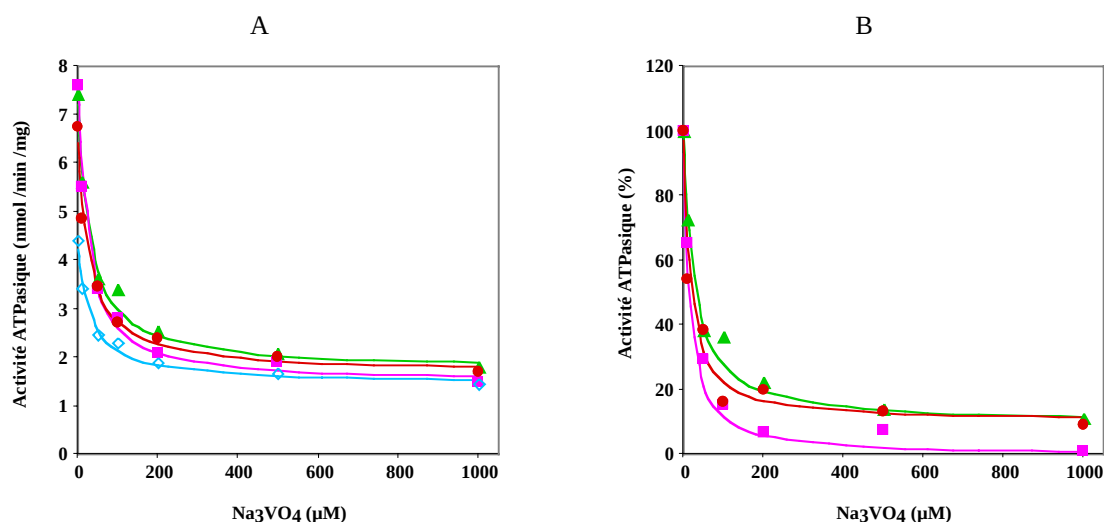


Figure 32. Effet du vanadate sur l'activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir des souches SUPERYOR Δ yor1 ($\diamond$), SUPERYOR ($\blacktriangle$), SUPERYOR-(His)₆ ($\bullet$) et SUPERYOR-(His)₁₀ ($\blacksquare$) de *Saccharomyces cerevisiae*. L'activité ATPasique a été mesurée à 37°C pendant 15 min dans 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, en présence de 10 μ M [γ -³²P]ATP (200 Ci/mol), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 50 mM KNO₃, 5 mM NaN₃, 10 μ M EDTA, 0,2 mM DTT, 2 % glycérol, 30 μ g /ml de protéines membranaires, et en présence de vanadate (Na₃VO₄) aux concentrations indiquées sur la figure. Pour chaque concentration de vanadate, l'activité reportée sur la figure B correspond à la différence entre l'activité dans la souche étudiée et l'activité dans la souche témoin. Les données sont présentées sous forme de pourcentage par rapport à l'activité en absence de vanadate.

Étude des mutants E1392Q et H1423R de la protéine Yor1p

Pour confirmer que la différence entre les activités ATPasiques des souches produisant ou non Yor1p était bien due à cette protéine, nous avons construit puis analysé des souches exprimant une protéine Yor1p inactive.

Comme décrit dans l'*Introduction*, les analyses biochimiques et structurales des transporteurs ABC ont indiqué que le résidu Glu suivant immédiatement l'Asp conservé du Walker B, ainsi que l'histidine de la boucle H jouaient un rôle clé dans l'hydrolyse de l'ATP. Ces deux résidus avaient donc de bonnes chances d'être essentiels à l'activité de Yor1p et nous avons choisi de les modifier par mutagenèse dirigée.

Nous avons substitué le Glu 1392 par une glutamine et l'His 1423 par une arginine. Ces substitutions ont été effectuées sur un plasmide portant une partie du gène de la protéine Yor1p-(His)₁₀, puis introduites par recombinaison homologue au niveau du locus *PDR5* de la

souche SUPERYOR. À part les mutations E1392Q ou H1423R, les séquences des deux protéines mutantes sont rigoureusement identiques à celle de Yor1p-(His)₁₀.

Afin de vérifier si les protéines Yor1p-(His)₁₀ E1392Q et Yor1p-(His)₁₀ H1423R étaient bien exprimées, des extraits de membranes plasmiques ont été préparés à partir des deux souches mutantes. Comme le montre la figure 33, la comparaison avec des extraits provenant des souches SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ montre que ces quatre souches surexpriment des quantités équivalentes de Yor1p. Les protéines sauvages et mutantes sont donc produites en quantités semblables.

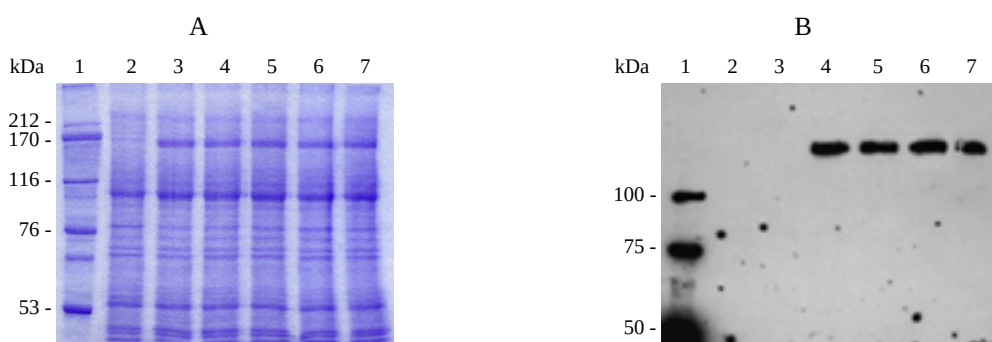


Figure 33. Analyse d'extraits de membrane de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. A. protéines colorées au bleu de Coomassie. B. immunodétection avec des anticorps anti RGS-His. Les deux gels ont été réalisés en parallèle, avec les mêmes échantillons de protéines membranaires. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR Δ yor1 (10 μ g de protéines). Puits 3 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR (10 μ g de protéines). Puits 4 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₆ (10 μ g de protéines). Puits 5 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ (10 μ g de protéines). Puits 6 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q (10 μ g de protéines). Puits 7 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ H1423R (10 μ g de protéines).

Ensuite, afin de déterminer l'effet des mutations E1392Q et H1423R sur l'activité de transport de la protéine, nous avons étudié la résistance à l'oligomycine et à la rhodamine B des souches mutantes. Les résultats présentés sur le tableau 5 montrent que chacune des deux mutations altère fortement la capacité de la levure à résister à l'oligomycine ou à la rhodamine B. Les deux souches s'arrêtent de pousser à 0,3 μ M d'oligomycine ou 200 μ M de rhodamine B, des concentrations identiques à celles qui inhibent la croissance de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1.

Avec d'autres produits toxiques vis-à-vis desquels Yor1p confère une résistance (doxorubicine, rhodamine 6G, verapamil), nous avons également constaté que les souches mutantes SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q et SUPERYOR-(His)₁₀ H1423R avaient un comportement voisin de celui de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1 (tableau 5).

Tableau 5. Effet de différents produits toxiques sur la croissance des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR-(His)₁₀, SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q et SUPERYOR-(His)₁₀ H1423R. Les cellules ont été cultivées pendant une nuit dans du milieu YPG à 30°C et diluées dans de l'eau de façon à obtenir une D.O. finale de 1, 0,1 ou 0,01 à 650 nm. Des gouttes de 5 μ l ont été déposées sur des boîtes de YPGA contenant de différentes concentrations de produit toxique. Les boîtes ont été analysées après 2 jours de culture à 30°C. La concentration inhibitrice de croissance (CIC) est définie comme la concentration de produit toxique la plus faible à laquelle les levures ne parviennent plus à pousser.

	Concentration inhibitrice de croissance		
	SUPERYOR Δ yor1	SUPERYOR-(His) ₁₀	SUPERYOR-(His) ₁₀ E1392Q SUPERYOR-(His) ₁₀ H1423R
Oligomycine	0,3 μ M	> 100 μ M	0,3 μ M
Rhodamine B	200 μ M	7,5 mM	200 μ M
Doxorubicine	25 μ M	250 μ M	25 μ M
Rhodamine 6G	1 μ M	200 μ M	2 μ M
Verapamil	0,8 mM	2 mM	0,8 mM

Le transport actif de la rhodamine B par des cellules SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q et SUPERYOR-(His)₁₀ H1423R, mesuré comme déjà décrit dans le cas de la souche SUPERYOR, montre que les mutations E1392Q et H1423R altèrent fortement l'export de la rhodamine B (figure 34). La fluorescence à l'extérieur des cellules augmente à une vitesse proche de celle que l'on observe avec la souche témoin SUPERYOR Δ yor1. Ainsi, chacune des deux mutations entraîne une baisse de plus de 95 % de la vitesse du transport de la rhodamine B par des cellules entières.

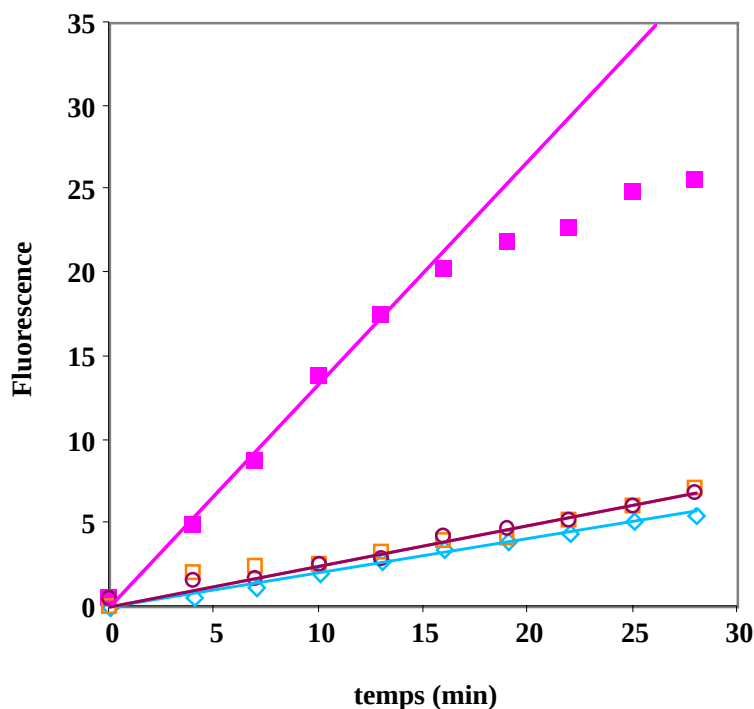


Figure 34. Exportation de la rhodamine B par des cellules des souches SUPERYOR Δ yor1 (◆), SUPERYOR-(His)₁₀ (■), SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q (○) et SUPERYOR-(His)₁₀ H1423R (□) de *Saccharomyces cerevisiae*. Des cellules de ces différentes souches ont été appauvries en ATP et chargées avec de la rhodamine B pendant 2 heures à température ambiante. Après des lavages intensifs, du glucose a été ajouté à une concentration finale de 200 mM. Aux temps indiqués, des aliquots de 1,2 ml ont été prélevés. Après centrifugation, la fluorescence de la rhodamine B dans les surnageants a été mesurée.

Ces résultats, ainsi que ceux des tests de toxicité, indiquent que chacune des mutations E1392Q et H1423R diminue très fortement l'activité de transport de la protéine Yor1p.

Nous avons ensuite voulu savoir si les protéines Yor1p-(His)₁₀ E1392Q et Yor1p-(His)₁₀ H1423R étaient repliées correctement et, pour cela, nous avons comparé la fixation du 8-azido-[α -³²P]ATP sur les protéines mutantes Yor1p-(His)₁₀ E1392Q et Yor1p-(His)₁₀ H1423R et sur les protéines sauvages Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀. Les résultats présentés sur la figure 35 montrent que les deux protéines mutantes sont marquées par le 8-azido-[α -³²P]ATP de la même manière que les protéines sauvages. Ce résultat suggère, d'une part, que les protéines mutantes sont repliées correctement et, d'autre part, que les mutations n'ont pas aboli la capacité de la protéine à lier l'ATP. Rappelons toutefois que les deux mutations sont situées dans le domaine NBD2 et que les protéines Yor1p-(His)₁₀ E1392Q et Yor1p-(His)₁₀ H1423R possèdent donc un domaine NBD1 intact. Un marquage préférentiel au niveau du

NBD1 pourrait ainsi avoir masqué une différence de marquage au niveau des NBD2 sauvage ou mutants.

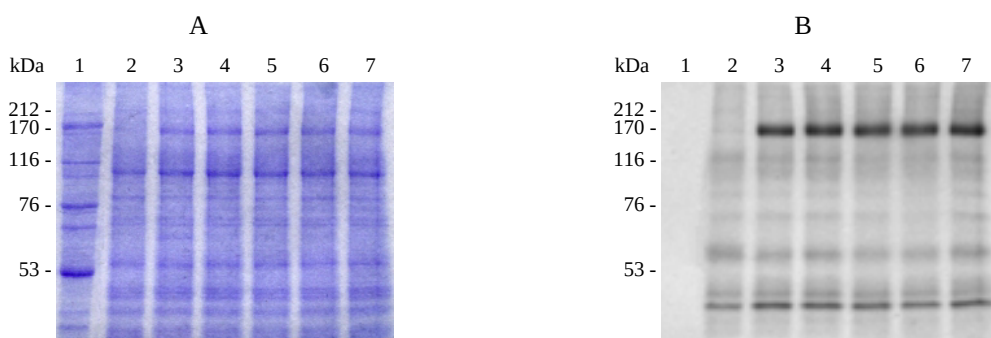


Figure 35. Marquage d'extraits de membranes plasmiques de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* par le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. A. protéines colorées au bleu de Coomassie. B. autoradiographie. Tous les marquages ont été effectués sur 10 μg de protéines membranaires, à 4°C, dans un volume final de 20 μl , comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. L'intégralité du mélange de marquage a été déposée sur le gel. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR Δyor1 . Puits 3 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR. Puits 4 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₆. Puits 5 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀. Puits 6 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q. Puits 7 : extrait de protéines membranaires de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ H1423R.

Nous avons alors mesuré l'activité ATPasique dans des extraits de membranes plasmiques des souches SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q et SUPERYOR-(His)₁₀ H1423R. Ces extraits possèdent une activité ATPasique ($4,9 \pm 0,7$ nmol et $5,0 \pm 0,5$ nmol /min /mg de protéines, respectivement) voisine de celle des extraits de la souche témoin SUPERYOR Δyor1 ($4,8 \pm 0,1$ nmol /min /mg de protéines).

L'ensemble de ces résultats confirme donc que le supplément d'activité ATPasique observé dans les membranes des souches SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ reflète l'activité de la protéine Yor1p. Ils indiquent également que la mutagenèse du résidu Glu 1392 en Gln ou du résidu His 1423 en Arg altère fortement l'activité ATPasique de la protéine Yor1p, sans cependant, abolir la capacité de cette protéine à interagir avec l'ATP.

Caractérisation de l'activité ATPasique des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ dans des extraits de membranes plasmiques

Pour déterminer les constantes catalytiques de la réaction d'hydrolyse de l'ATP catalysée par Yor1p, nous avons mesuré la vitesse initiale de cette réaction à différentes concentrations d'ATP. À l'activité mesurée dans les extraits des souches SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀, nous avons systématiquement soustrait l'activité mesurée dans les mêmes conditions dans les extraits de la souche témoin SUPERYOR Δ yor1. Les données obtenues ont pu être interprétées de façon satisfaisante en supposant une variation hyperbolique de la vitesse en fonction de la concentration d'ATP. Nous en avons déduit que les protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ avaient des $V_{\max}$ identiques de 290 ± 10 nmol /min /mg ($0,8 \pm 0,03$ s⁻¹) et des K_m pour l'ATP voisins : 50 ± 8 μ M pour Yor1p, 40 ± 7 μ M pour Yor1p-(His)₆ et 65 ± 10 μ M pour Yor1p-(His)₁₀. Les données expérimentales auraient également pu être interprétées de façon satisfaisante en utilisant le modèle de Hill, à condition de choisir un nombre de Hill n_H inférieur à 1,6. Par contre, l'activité dans la souche témoin correspond vraisemblablement à la somme de plusieurs activités distinctes car les données obtenues avec cette souche ne peuvent pas être interprétées correctement ni avec le modèle de Michaelis-Menten, ni avec celui de Hill.

Les activités ATPasiques spécifiques de protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ ont des valeurs comparables à celle précédemment mesurée par Decottignies *et al.* (1998) après la solubilisation de Yor1p et sa purification partielle par ultracentrifugation sur un gradient de sucrose ($V_{\max}$ de ~ 500 nmol /min /mg et K_m pour l'ATP de 300 μ M).

Cependant, ces activités sont plus faibles que celles d'autres protéines ABC également dosées dans des membranes plasmiques. Par exemple, des valeurs de $V_{\max}$ de 3,4 μ mol /min /mg ont été mesurées pour la P-glycoprotéine de hamster (Al-Shawi et Senior, 1993) ou de 2,5 et 1,7 μ mol /min /mg pour les protéines de levure Pdr5p et Snq2p, respectivement (Decottignies *et al.*, 1995). Nous ne pouvons pas savoir actuellement si la faible activité que nous observons pour Yor1p (i) correspond à une propriété intrinsèque de cette protéine ou (ii) si le cassage de cellules a perturbé l'environnement de la protéine et entraîné une baisse de son activité spécifique ou encore (iii) si, dans les cellules sur produisant Yor1p, une partie de molécules de Yor1p est produite sous forme non fonctionnelle, ce qui diminuerait l'activité spécifique globale de notre échantillon de protéine.

Effet des substrats sur l'activité des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ dans des extraits de membranes plasmiques

Comme les transporteurs ABC utilisent l'énergie fournie par l'ATP pour transporter leurs substrats, il est logique que la présence de ces substrats active l'activité ATPasique de ces protéines. C'est effectivement ce qui a été observé dans le cas de la protéine HisQMP₂ (Bishop *et al.*, 1989), de la P-glycoprotéine (Ambudkar *et al.*, 1992, 1999) ou de MRP1 (Chang *et al.*, 1997). Cependant, à l'inverse, on peut noter que, dans le cas de Yor1p, il a été montré que l'oligomycine inhibait l'activité ATPasique de la protéine partiellement purifiée (Decottignies *et al.*, 1998).

Nous avons analysé l'influence de l'oligomycine, des rhodamines B, 6G et 101, de la doxorubicine et du verapamil sur l'activité ATPasique des extraits de membranes plasmiques des souches SUPERYOR Δ yor1, SUPERYOR, SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀. Comme montré dans la figure 36, aucun des composés ci-dessus n'a stimulé l'activité ATPasique attribuée à Yor1p. Au contraire, cette activité a été inhibée par l'oligomycine avec un IC₅₀ de $6,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$, par les rhodamines B (IC₅₀ = $5,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$), 6G (IC₅₀ = $1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$) et 101 (IC₅₀ = $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$), par la doxorubicine (IC₅₀ = $73 \pm 5 \mu\text{M}$) et par le verapamil (IC₅₀ = $42 \pm 12 \mu\text{M}$). Des résultats similaires ont été obtenus avec des membranes des souches SUPERYOR-(His)₆ ou SUPERYOR-(His)₁₀. Avec des membranes extraites de la souche témoin, l'effet de ces produits sur l'activité ATPasique est resté faible (moins de 20 % d'inhibition).

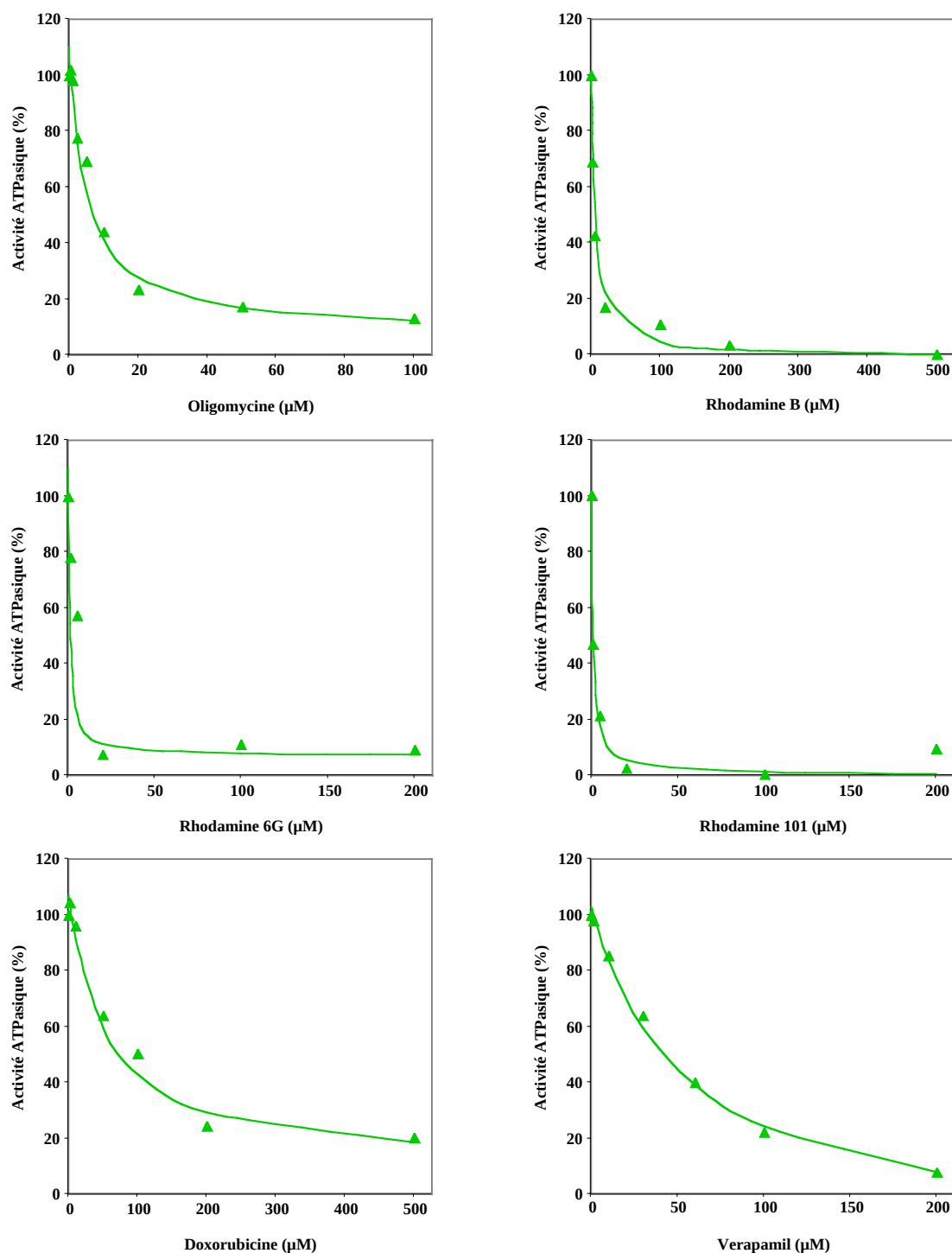


Figure 36. Effet de différents substrats potentiels sur l'activité ATPasique d'extraits de membranes plasmiques de la souche SUPERYOR (▲), après soustraction de l'activité mesurée dans les mêmes conditions avec des extraits de la souche témoin SUPERYORΔyor1 (les données sont présentées en pourcentage de l'activité en absence de substrat). L'activité ATPasique a été mesurée à 37°C pendant 15 min dans 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, en présence de 10 μM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (200 Ci/mol), 2 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 50 mM de KNO_3 , 5 mM de NaN_3 , 10 μM d'EDTA, 0,2 mM de DTT, 2 % de glycérol, 30 μg/ml de protéines membranaires et de différentes concentrations d'oligomycine, de rhodamine B, 6G ou 101, de doxorubicine ou de verapamil.

Pour analyser plus en détail ces résultats inattendus, nous avons réalisé des expériences complémentaires avec l'oligomycine.

Dans un premier temps, pour exclure la possibilité que ce produit cause la dénaturation de la protéine Yor1p, les extraits de membranes plasmiques ont été incubés avec de l'oligomycine, à une concentration de 5 μ M, proche du IC₅₀ déterminé pour ce composé (voir ci-dessus). Puis, des aliquots ont été prélevés au cours du temps et l'activité ATPasique présente dans ces aliquots a été immédiatement mesurée. Au cours d'une période de 2 heures, nous n'avons observé aucune variation de l'activité ATPasique. L'incubation prolongée de la protéine en présence d'oligomycine ne provoque donc pas une inactivation de la protéine.

Nous avons également voulu savoir si l'oligomycine empêchait la fixation de l'ATP au niveau des domaines NBD. En effet, il a été montré que certains composés inhibent l'activité ATPasique de protéines ABC grâce à leur capacité d'interagir avec les domaines NBD et de bloquer la fixation de l'ATP au niveau du site actif. C'est le cas, par exemple, des flavonoïdes qui sont de modulateurs de la P-gp (Conseil *et al.*, 1998) ou de la genistéine qui module l'activité de CFTR (Randak *et al.*, 1999). Nous avons donc examiné l'effet de l'oligomycine sur la fixation du 8-azido-[α -³²P]ATP sur Yor1p. Les résultats présentés sur la figure 37 montrent que la fixation du 8-azido-[α -³²P]ATP sur Yor1p n'est pas modifiée par la présence d'oligomycine ajoutée à des concentrations allant de 1 à 100 μ M. Ce résultat suggère que l'inhibition de l'hydrolyse de l'ATP ne provient pas d'une inhibition par l'oligomycine de la fixation de l'ATP au niveau des NBD.

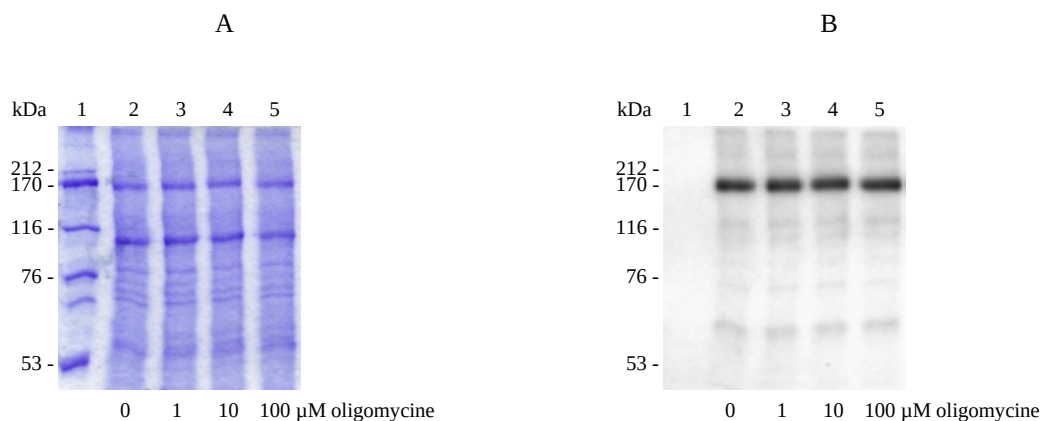


Figure 37. Marquage par le 8-azido-[α - 32 P]ATP d'extraits de membranes plasmiques préparés à partir de la souche SUPERYOR et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. A. protéines colorées au bleu de Coomassie. B. autoradiographie. Tous les marquages ont été effectués sur 10 μ g de protéines membranaires, à 4°C, dans un volume final de 20 μ l, comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. L'intégralité du mélange de marquage a été déposée sur le gel. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 à 5 : extraits de protéines membranaires de la souche SUPERYOR marqués par le 8-azido-[α - 32 P]ATP en présence de différentes concentrations d'oligomycine.

Discussion

La mesure des activités ATPasique des protéines Yor1p, Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ dans des extraits de membranes plasmiques, ainsi que le photo-marquage par le 8-azido-[α - 32 P]ATP confirment à nouveau que les protéines Yor1p poly-histidylées se comportent comme la protéine sauvage, Yor1p.

Nous avons détecté une activité spécifique de Yor1p dans la membrane plasmique. Les substrats potentiels de cette protéine n'ont cependant pas stimulé cette activité. Au contraire, aussi bien l'oligomycine, que les rhodamines B, 6G et 101, la doxorubicine ou le verapamil ont exercé un effet inhibiteur. Un tel comportement a déjà été observé pour d'autres protéines ABC. Ainsi, il a été montré que la cyclosporine A était transportée par la P-gp et, cependant, elle inhibe l'activité ATPasique de cette protéine dans des extraits de membrane plasmique (Ejendal et Hrycyna, 2005). Dans le cas d'ABCG2, un même effet a été obtenu avec le Hoechst 33342 (Ozvegy *et al.*, 2002). Le miconazole est un inhibiteur de l'activité de Pdr5p (Decottignies *et al.*, 1994). Pourtant, ce composé est plus toxique pour une souche $\Delta pdr5$, ce qui suggère que Pdr5p est impliquée dans la détoxification du miconazole (Kolaczowski *et al.*, 1998)).

Il avait déjà été montré que l'oligomycine inhibait l'activité ATPasique de Yor1p partiellement purifiée (Decottignies *et al.*, 1998). En relation avec cette observation, on peut rappeler que Cui *et al.* ont suggéré que l'oligomycine était probablement modifiée dans la cellule par l'hydrolyse d'une liaison ester et transformée en un produit contenant un groupement carboxyle. Ce produit serait le substrat de Yor1p (Cui *et al.*, 1996). Cette idée pourrait expliquer la non-stimulation de Yor1p par l'oligomycine. En réalité, le transport actif de substrats potentiels tels que l'oligomycine, la doxorubicine, la tétracycline, les rhodamines B, 6G ou 101 et le verapamil est déduit d'études de résistance à ces produits ou de mesures de vitesse d'efflux par des cellules intactes, mais n'a jamais été démontré. Nous ne pouvons donc pas exclure que tous ces produits soient modifiés dans la cellule avant d'être transportés par Yor1p.

Cui *et al.* ont également suggéré que l'oligomycine puisse être transportée par Yor1p sous forme conjuguée au glutathion (Cui *et al.*, 1996). Yor1p pourrait ainsi être une pompe à glutathion comme d'autres protéines de la sous-famille ABCC. Étant donné que l'activité de MRP1 est stimulée par le glutathion ou par les conjugués formés par les substrats de MRP1 avec celui-ci (Chang *et al.*, 1997), nous avons voulu savoir si le glutathion avait une influence sur l'activité de Yor1p. Pour cela, nous avons mesuré l'activité ATPasique des membranes de SUPERYOR et SUPERYOR Δ yor1 en présence, à la fois, de différentes concentrations de glutathion (de 0 à 500 μ M) et d'oligomycine à une concentration de 0 ou 5 μ M (concentration proche du IC₅₀ déterminé pour ce composé (voir ci-dessus)). Le glutathion n'a eu aucun effet ni activateur, ni inhibiteur. Ce résultat tend à indiquer que, si Yor1p réalise un co-transport de l'oligomycine, celui-ci ne s'effectuerait pas avec du glutathion.

Il est également possible que Yor1p ait besoin d'un cofacteur jusqu'ici non identifié pour transporter les produits toxiques à travers la membrane. La perte de ce cofacteur lors de la préparation des membranes plasmiques pourrait expliquer l'absence de stimulation de l'activité ATPasique basale de Yor1p à la suite à la fixation du substrat au niveau des TMD.

D'autre part, il a été envisagé que l'activité basale (en absence de substrat) des transporteurs ABC était due à la présence de substrats endogènes (dans la plupart de cas inconnus) dans les préparations de membranes plasmiques (Ozvegy *et al.*, 2002, Garrigues *et al.*, 2002a). L'activité d'une protéine ABC pourrait donc être déjà partiellement ou complètement stimulée par ce substrat endogène. Il est alors possible que l'addition d'autres substrats transportés par la protéine se traduise par une inhibition de l'activité ATPasique s'il s'agit de substrats compétitifs ayant un $V_{\max}$ plus faible que celui du substrat endogène. Dans le cas de la P-gp,

un tel substrat endogène est vraisemblablement un lipide (Garrigues *et al.*, 2002a). Cela pourrait être aussi le cas de Yor1p, puisque cette protéine a également été décrite comme étant une flippase de lipides (Decottignies *et al.*, 1998, Boujaoude *et al.*, 2001).

Le protocole de préparation des membranes plasmiques pourrait aussi influencer l'activité de Yor1p. Le cassage de cellules entraîne un changement du potentiel de membrane et est susceptible de modifier l'environnement lipidique de Yor1p. On peut imaginer qu'à la suite de ces changements, la protéine Yor1p conserve une activité ATPasique basale, qu'elle peut toujours fixer ses substrats à partir d'une des faces de la membrane, mais que le substrat ne peut plus être libéré de l'autre côté de la membrane. En présence de substrats, la protéine se retrouverait donc bloquée dans une configuration inactive, où il n'y aurait plus ni hydrolyse d'ATP ni transport du substrat.

Notons pour finir, que l'inhibition par les substrats potentiels suggère que ceux-ci peuvent toujours interagir avec Yor1p après le cassage des cellules.

Résultats

Chapitre II

Étude domaines NBD1 et NBD2 de Yor1p

Du point de vue structural, tous les transporteurs ABC contiennent deux domaines NBD, qui lient et hydrolysent l'ATP. Chez les procaryotes, ces domaines sont souvent exprimés individuellement, alors que chez les eucaryotes, ils sont fusionnés aux domaines TMD (voir l'*Introduction* et la figure 1).

Les domaines NBD procaryotes sont donc des protéines solubles, ce qui facilite grandement leur étude. Les domaines NBD des transporteurs bactériens de l'histidine (la protéine HisP) et du maltose (la protéine MalK) ont ainsi été intensivement caractérisés aussi bien du point de vue structural que biochimique, ce qui a permis l'élucidation de certains aspects du fonctionnement des domaines NBD (voir l'*Introduction*). Des études ont également été menées sur les domaines NBD des protéines eucaryotes, mais leur fusion génétique avec un domaine extrêmement hydrophobe complique cette tâche. La production de domaines NBD eucaryotes sous forme isolée offre la possibilité de travailler sur un système beaucoup plus simple que celui de la protéine entière. Des informations structurales et fonctionnelles sur plusieurs protéines ABC ont été ainsi obtenues (voir l'*Introduction*).

Afin de pouvoir étudier l'activité ATPasique des domaines NBD de Yor1p, ainsi que de la fixation de l'ATP sur ces domaines, nous les avons produits sous forme isolée chez la bactérie *Escherichia coli*, puis purifiés à homogénéité.

Production et purification des domaines NBD1 et NBD2 de Yor1p

Définition de limites des domaines NBD

L'expression hétérologue des domaines NBD des protéines ABC eucaryotes a été fréquemment difficile à cause de la formation de corps d'inclusion contenant le domaine NBD mal replié et agrégé. Des études systématiques ont démontré que la définition des limites des domaines NBD était très importante pour leur expression sous forme soluble chez *Escherichia coli* (c'est le cas, par exemple, des domaines de la P-glycoprotéine humaine (Kerr *et al.*, 2003) ou de la protéine CFTR de souris (Lewis *et al.*, 2004)).

Pour définir les limites des domaines NBD de Yor1p, nous avons utilisé des alignements de séquences de quelques protéines ABC humaines et de levure appartenant à la sous-famille ABCC, de la P-glycoprotéine humaine, ainsi que les séquences de quelques NBD dont la structure à haute résolution a été déterminée (Annexes 2 et 3). Au vu de ces alignements, nous avons défini plusieurs segments pouvant correspondre à chacun des deux NBD de la protéine Yor1p (tableau 6) et nous les avons exprimés chez *Escherichia coli*. Dans le cas du NBD1, nous nous sommes notamment appuyés sur la structure du domaine NBD1 de CFTR, protéine appartenant à la même sous-famille ABCC que Yor1p (Lewis *et al.*, 2004).

Tableau 6. Les segments pouvant correspondre à chacun des deux NBD de la protéine Yor1p.

Construction n° :	les résidus de la protéine Yor1p entière correspondant à :	
	NBD1	NBD2
1.	521-815	1202-1477
2.	523-815	1205-1477
3.	527-815	1209-1477
4.	519-815	
5.	519-813	

Les fragments d'ADN correspondants ont été amplifiés par PCR et introduits dans le vecteur d'expression procaryote pET15b1pa (voir la partie *Matériels et méthodes*). Le gène exprimant le NBD est ainsi placé sous le contrôle du promoteur F10 (promoteur du gène 10 du phage T7), reconnu par l'ARN polymérase du phage T7. De plus, le plasmide pET15b1pa, permet d'ajouter une séquence de 21 acides aminés codant un peptide de poly-histidine à l'extrémité N-terminale de chaque NBD, afin de pouvoir ensuite purifier le domaine par chromatographie d'affinité sur des colonnes greffées avec des ions métalliques. L'expression de la protéine est réalisée dans la souche Rosetta(DE3) pLacI d'*Escherichia coli* qui contient, intégrée dans son génome, une cassette dans laquelle le gène de l'ARN polymérase du phage T7 est placé sous le contrôle du promoteur lactose, ainsi qu'un plasmide (pLacIRARE) contenant un gène de résistance au chloramphénicol et les gènes de 10 ARNt peu abondants chez la bactérie sauvage.

En analysant par électrophorèse sur gel de polyacrylamide les extraits bruts et les culots contenant les protéines insolubles, on peut évaluer le niveau d'expression, et savoir en même temps si le domaine NBD est exprimé sous forme soluble ou dans des corps d'inclusions. Des expériences préliminaires ont montré que le temps et la température d'induction par l'IPTG

étaient très importants pour minimiser la quantité de protéines insolubles. Les résultats présentés sur la figure 38 montrent que, même dans les meilleures conditions trouvées, toutes les constructions conduisent à l'incorporation d'une certaine proportion de la protéine dans des corps d'inclusions. Dans le cas de NBD2, cette proportion est assez faible et, d'une manière générale, moins importante que dans le cas de NBD1. Les constructions n° 2 et 5 pour le domaine NBD1 permettent de retrouver ~50 % de la protéine sous forme soluble, alors que, pour les trois autres constructions, le domaine NBD1 se retrouve majoritairement dans des corps d'inclusions. Nous avons donc choisi de poursuivre la purification de ces domaines avec la construction n° 2 pour le NBD1 (dont la séquence correspond aux acides aminés 523 à 815 de la protéine entière) et la construction n° 1 pour le NBD2 (dont la séquence correspond aux 276 derniers acides aminés de Yor1p).

Le NBD1 retenu contient 314 acides aminés et a un poids moléculaire de 34925 Da, alors que le NBD2 retenu contient 297 acides aminés et a un poids moléculaire de 33346 Da.

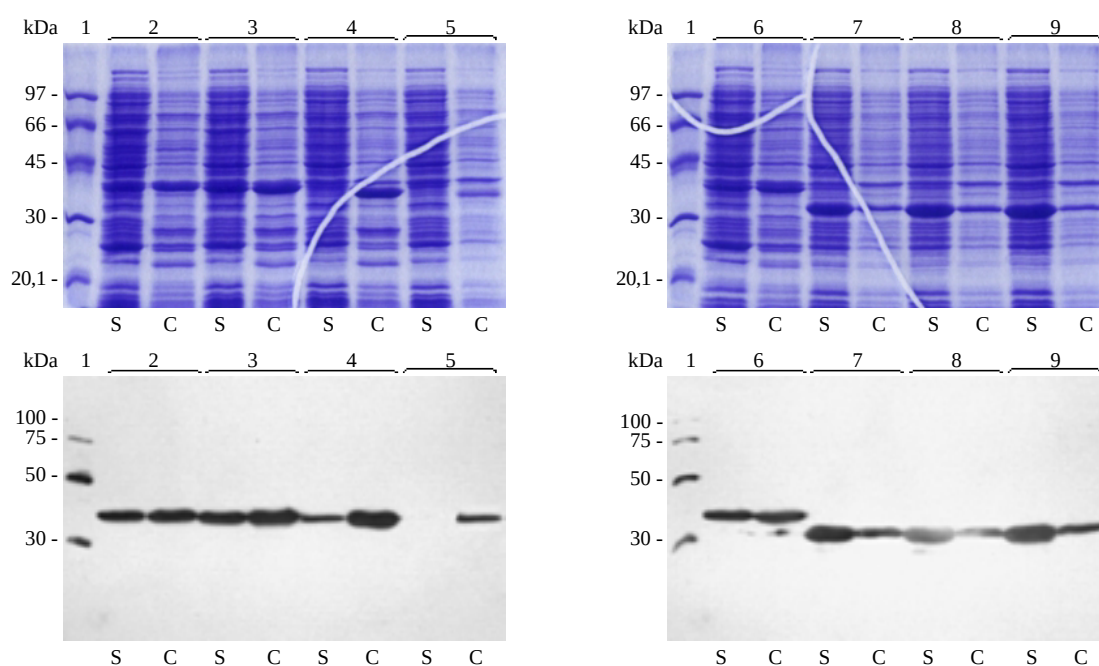


Figure 38. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide d'extraits bruts de souches d'*Escherichia coli* produisant les domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p. En haut : protéines colorées au bleu de Coomassie. En bas : immunodétection avec des anticorps anti RGS-His. Les deux gels ont été réalisés en parallèle, avec les mêmes échantillons de protéines. Chaque paire de puits représente le surnageant (S) et le culot (C) obtenus après le cassage des bactéries. Puits 1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits 2 : construction n° 1 de NBD1. Puits 3 : construction n° 2 de NBD1. Puits 4 : construction n° 3 de NBD1. Puits 5 : construction n° 4 de NBD1. Puits 6 : construction n° 5 de NBD1. Puits 7 : construction n° 1 de NBD2. Puits 8 : construction n° 2 de NBD2. Puits 9 : construction n° 3 de NBD2.

Purification des domaines NBD

Pour la purification des deux domaines NBD, nous avons pris avantage de la queue de poly-histidine ajoutée à l'extrémité N-terminale de chaque NBD. Après cassage des bactéries aux ultrasons et récupération des extraits bruts par centrifugation, une première chromatographie sur une colonne contenant des ions Co^{2+} a permis de retenir sélectivement les protéines poly-histidylées. L'éluat de la colonne de Co^{2+} a ensuite été appliqué sur un tamis moléculaire (Superdex 75) qui a permis d'obtenir la purification à homogénéité des deux domaines NBD de Yor1p. La figure 39 montre comme exemple les résultats obtenus pour NBD2.

Cependant, dans les deux cas, nous avons observé une tendance de la protéine à s'agréger. En effet, une partie de la protéine éluée de la colonne de Co^{2+} , a été retrouvée dans le volume mort du tamis moléculaire (fractions 44-48). Dans le cas du NBD1, cette tendance à s'agréger est plus forte et la présence de 500 mM de NaCl lors de toutes les étapes de la purification s'est avérée nécessaire pour éviter la précipitation de la protéine.

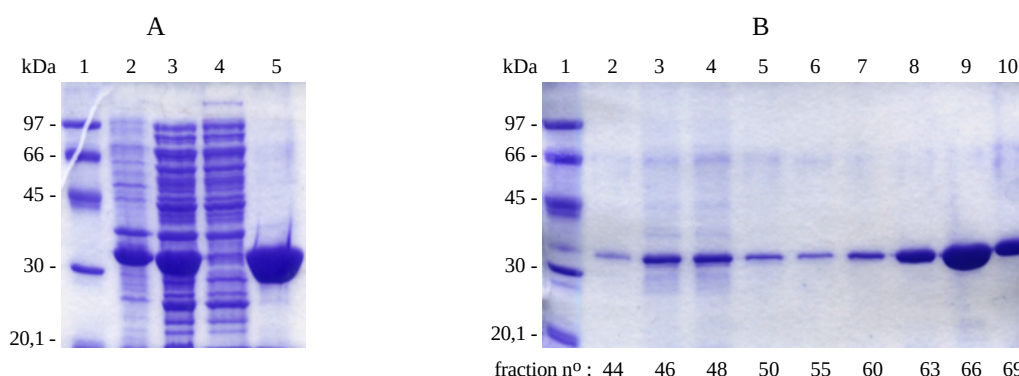


Figure 39. Purification du domaine NBD2 de la protéine Yor1p par chromatographie d'affinité sur une colonne de Co^{2+} (A) et par filtration sur une colonne Superdex 75 (B), à partir d'un extrait brut des protéines cytoplasmiques. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire. Puits 2 : culot obtenu après le cassage des bactéries. Puits 3 : extrait brut de protéines cytoplasmiques. Puits 4 : protéines non retenues sur la colonne de Co^{2+} . Puits 5 : élution à 100 mM d'imidazole. Puits 6 à 14 : différentes fractions issues de la colonne de Superdex 75.

Après purification et séparation des formes agrégées, les domaines NBD ont été conservés à -20°C dans un tampon contenant 500 mM NaCl. Dans ces conditions, les domaines NBD restent sous forme monomérique, comme l'indique une analyse par filtration HPLC réalisée sur une colonne de TSK G3000SW_{XL} après plusieurs semaines de stockage. Un exemple

d'analyse HPLC réalisé pour déterminer l'état d'oligomérisation des domaines NBD est présenté dans la figure 40.

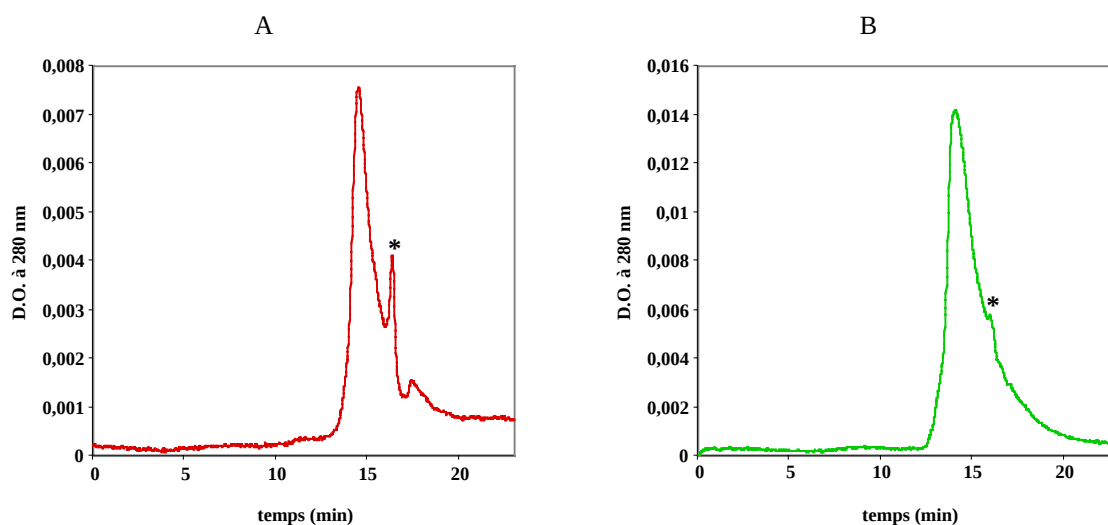


Figure 40. Filtration HPLC des domaines NBD1 (A) et NBD2 (B) sur une colonne de TSK G3000SW_{XL}. L'élution a été effectuée dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7, 10 % glycérol (volume /volume), 500 mM NaCl, à un débit de 0,7 ml /min. Les temps de rétention ont été de 9,25 min pour la phénylalaninyl-ARNt synthétase d'*Escherichia coli* (240 kDa), de 11,2 min pour la L-lactate déshydrogénase bovine (140 kDa) et de 12,2 min pour la forme monomérique de la méthioninyl-ARNt synthétase d'*Escherichia coli* (64 kDa). Le pic visible à 16,3 min, indiqué par un astérisque, correspond à un composé contaminant de petit poids moléculaire.

Nous avons également montré que les domaines restaient sous forme monomérique lors d'une incubation de plusieurs heures à 4°C, dans un tampon contenant 20 % de glycérol. Lors d'une incubation des domaines à 37°C dans ce même tampon, nous avons constaté que la proportion de formes agrégées augmentait avec le temps, mais ne dépassait pas 20 % après 15 minutes d'incubation.

Activité des domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p

Interaction avec des nucléotides

Dans un premier temps, pour vérifier l'intégrité et le bon repliement de chacun des domaines NBD de la protéine Yor1p, nous avons étudié leur interaction avec des nucléotides en utilisant des dérivés photo-activables ou fluorescents de l'ATP.

Marquage par le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP

Nous avons d'abord montré que les domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p fixaient le 8-azido-ATP radioactif (figure 41). Cette fixation est spécifique car elle est diminuée par la présence d'ATP. Dans les conditions utilisées (4°C, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 % glycérol), l'interaction entre le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP et le NBD1 ne dépend pas de la présence d'ions Mg^{2+} , alors que l'interaction avec le NBD2 est plus faible en présence de Mg^{2+} . Une diminution de l'affinité pour l'ATP en présence de quantités millimolaires de Mg^{2+} a déjà été constatée pour de protéine ABC entières, comme la P-gp (Lerner-Marmarosh *et al.*, 1999). Dans le cas de la protéine Yor1p entière, nous avons constaté que la présence de magnésium stimulait la fixation du 8-azido-ATP (vois ci-dessus). Les ions Mg^{2+} ont donc un effet opposé sur l'affinité de l'ATP pour la protéine entière et sur l'affinité de ce nucléotide pour les domaines isolés. Ce comportement rappelle celui qui a été observé avec d'autres types d'ATPases comme, par exemple, la Ca^{2+} -ATPase (une P-ATPase) de rat (Lacapère *et al.*, 1990, Champeil *et al.*, 1998).

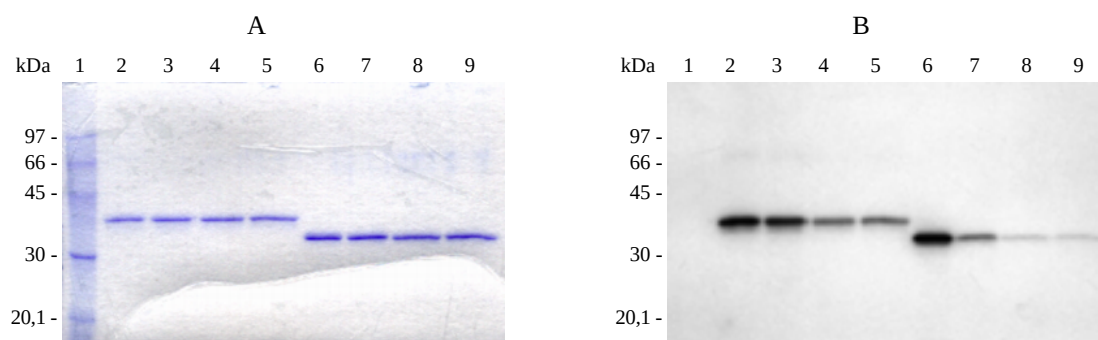


Figure 41. Marquage des domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p par le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. A. protéines colorées au bleu de Coomassie. B. autoradiographie. Tous les marquages ont été effectués avec 1 μM de NBD1 ou de NBD2, à 4°C, dans un volume final de 20 μl , comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. L'intégralité du mélange de marquage a été déposée sur le gel. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire. Puits 2 : NBD1. Puits 3 : NBD1 + 2 mM MgCl_2 . Puits 4 : NBD1 + 10 mM ATP. Puits 5 : NBD1 + 2 mM MgCl_2 + 10 mM ATP. Puits 6 : NBD2. Puits 7 : NBD2 + 2 mM MgCl_2 . Puits 8 : NBD2 + 10 mM ATP. Puits 9 : NBD2 + 2 mM MgCl_2 + 10 mM ATP.

Interaction avec le TNP-ATP, un dérivé fluorescent de l'ATP

Le TNP-ATP (2'-(ou-3')-O-(2, 4, 6-trinitrophényl)-adénosine 5'-triphosphate) est un dérivé fluorescent de l'ATP. Sa fluorescence, très faible dans une solution aqueuse, augmente fortement lorsqu'il se fixe à une protéine. Son spectre d'absorption présente plusieurs pics (259, 408 et 470 nm) avec un maximum à 408 nm, alors que son spectre d'émission présente un maximum entre 530 et 560 nm, dont la position dépend de la polarité du solvant.

Pour mettre en évidence une interaction entre les domaines NBD de Yor1p et le TNP-ATP, nous avons enregistré le spectre d'émission du TNP-ATP (12 μ M) en présence et en absence de protéine. Après une excitation à 408 nm, le TNP-ATP a un maximum d'émission à 550 nm en absence de protéine (figure 42). Lorsque le domaine NBD2 purifié est présent à une concentration de 6 μ M, on observe une augmentation de la fluorescence du TNP-ATP, ainsi qu'un déplacement du maximum d'émission vers le bleu, de 550 nm à 535 nm. Ces modifications traduisent la fixation du TNP-ATP sur le domaine NBD2. Un résultat similaire a été obtenu en utilisant le NBD1.

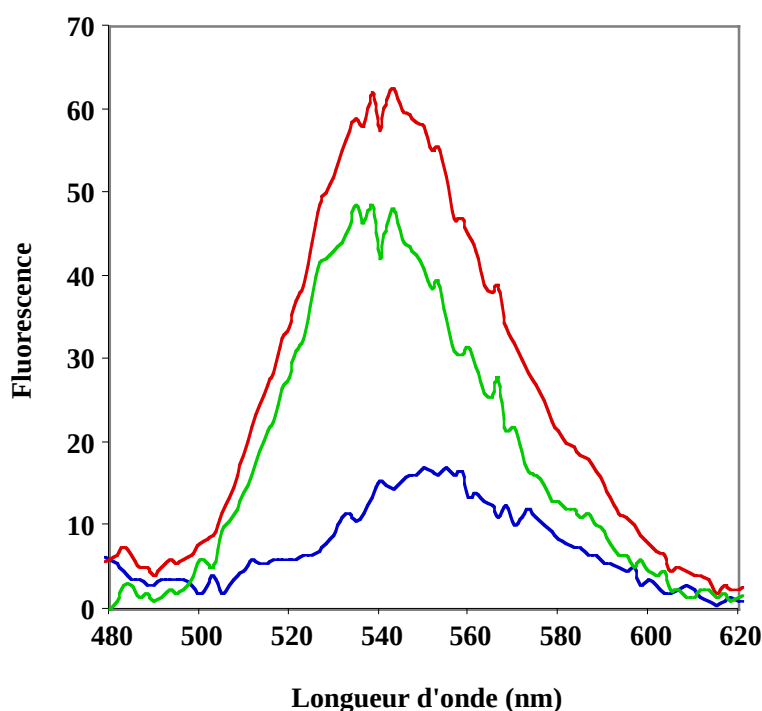


Figure 42. Spectre de fluorescence du TNP-ATP. Le spectre d'émission du TNP-ATP (12 μ M) a été enregistré entre 480 et 620 nm après une excitation à 408 nm en absence (courbe bleue) et en présence de 6 μ M du domaine NBD2 purifié (courbe rouge). La différence entre ces deux spectres est tracée en vert.

Pour déterminer les paramètres de cette fixation, nous avons enregistré la fluorescence du TNP-ATP à 535 nm, après une excitation à 408 nm, en présence de 6 μ M des domaines

NBD1 ou NBD2 et de concentrations croissantes de TNP-ATP. Les mesures ont été effectuées à 4°C pour éviter l'agrégation des domaines NBD, à pH 7,5 et en absence d'ions Mg^{2+} pour éviter toute hydrolyse pendant l'expérience (qui dure ~45 min lorsqu'on étudie la fixation du TNP-ATP et ~4 h lorsqu'on étudie le déplacement du TNP-ATP par d'autres nucléotides - voir plus loin).

Les résultats présentés sur la figure 43 montrent que le TNP-ATP se fixe sur les domaines NBD1 et NBD2 selon des courbes de saturation. L'analyse de ces courbes, selon l'équation décrite dans la partie *Matériels et méthodes*, nous a permis de déterminer que la constante de dissociation du TNP-ATP était de $0,4 \pm 0,2 \mu M$ pour le NBD1 et de $2,1 \pm 0,3 \mu M$ pour le NBD2.

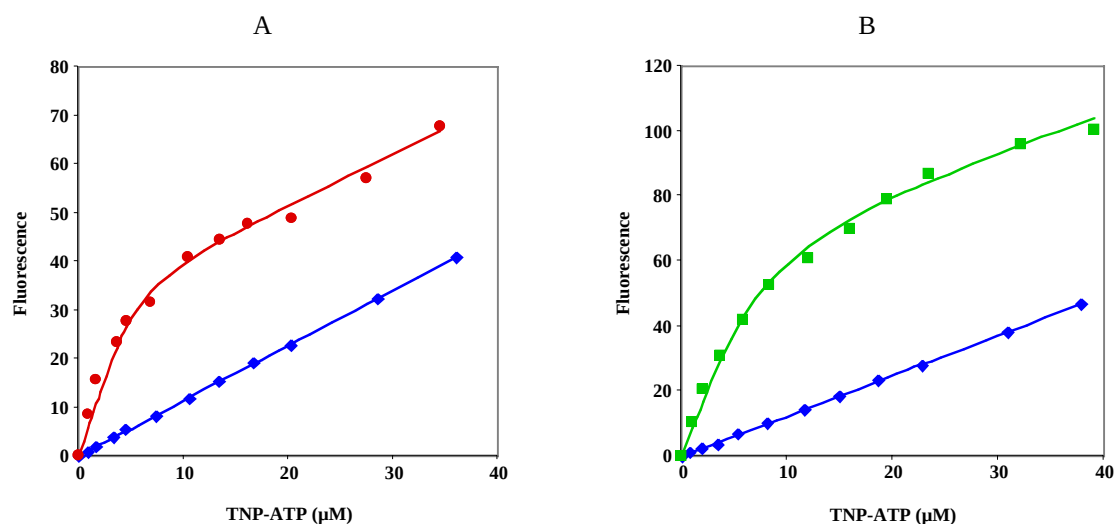


Figure 43. Fixation du TNP-ATP sur les domaines NBD1 (A) et NBD2 (B) de la protéine Yor1p. La fluorescence du TNP-ATP a été enregistrée à 535 nm, après une excitation à 408 nm. Les courbes représentent la fluorescence du TNP-ATP en absence de protéine (♦) ou en présence de 6 μM de NBD1 (●) ou de NBD2 (■), après correction de l'effet de filtre interne, comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*.

Lorsque des concentrations croissantes d'ATP ont été ajoutées à un mélange NBD : TNP-ATP, une diminution de l'intensité de la fluorescence à 535 nm a été observée (figure 44). Cela suggère que l'ATP entre en compétition avec le TNP-ATP au niveau de son site de fixation sur les NBD et diminue la concentration du TNP-ATP lié. Ce déplacement est pratiquement total aux fortes concentrations d'ATP (>10 mM). Cette expérience nous a permis de déduire que la constante de dissociation de l'ATP était de $30 \pm 5 \mu M$ pour le NBD1 et de $165 \pm 10 \mu M$ pour le NBD2.

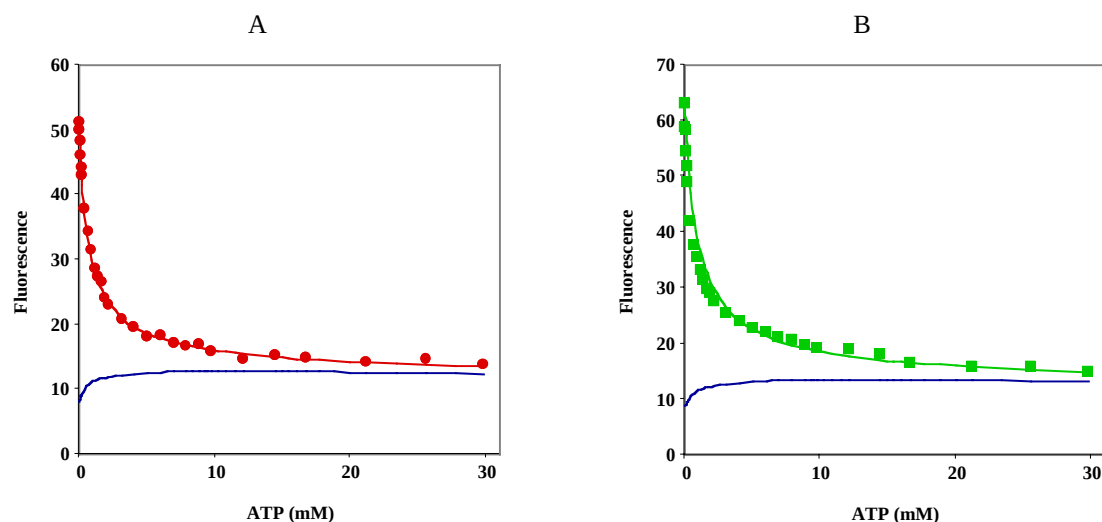


Figure 44. Déplacement du TNP-ATP (12 μ M) fixé sur les domaines NBD1 (A) et NBD2 (B) de la protéine Yor1p (6 μ M) par l'addition de concentrations croissantes d'ATP (0 à 30 mM). La fluorescence du TNP-ATP a été enregistrée à 535 nm, après une excitation à 408 nm. Les courbes ont été analysées comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. La contribution théorique provenant du TNP-ATP libre est représentée en bleu foncé.

Le TNP-ATP fixé sur NBD1 ou NBD2 peut être déplacé non seulement par l'ATP, mais aussi par d'autres nucléosides triphosphates. Le GTP, le CTP et l'UTP entraînent également, lorsque leurs concentrations augmentent, une diminution de l'intensité de la fluorescence à 535 nm. Leurs constantes de dissociation ont été ainsi déterminées (tableaux 7).

Tableaux 7. Constantes de dissociation des complexes formés entre les domaines NBD de Yor1p et l'ATP, le GTP, le CTP et l'UTP. Les expériences ont été réalisées avec 12 μ M de TNP-ATP, 6 μ M des domaines NBD1 ou NBD2 et des concentrations croissantes d'ATP, de GTP, de CTP ou d'UTP (de 0 à 30 mM). La fluorescence de TNP-ATP a été enregistrée à 535 nm, après une excitation à 408 nm.

	NBD1	NBD2
K_d (ATP) :	$30 \pm 5 \mu\text{M}$	$165 \pm 10 \mu\text{M}$
K_d (GTP) :	$40 \pm 5 \mu\text{M}$	$250 \pm 15 \mu\text{M}$
K_d (CTP) :	$70 \pm 10 \mu\text{M}$	$450 \pm 20 \mu\text{M}$
K_d (UTP) :	$110 \pm 10 \mu\text{M}$	$300 \pm 30 \mu\text{M}$

Activité ATPasique et dimérisation des domaines NBD1 et NBD2

Nous avons cherché à savoir si les domaines NBD de Yor1p purifiés possédaient une activité ATPasique. Cette activité a été recherchée à pH 7,5, en présence de 10 μM [γ - ^{32}P]ATP et de 2 mM MgCl_2 , comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Nous avons choisi d'effectuer des dosages pendant des temps courts (jamais supérieurs à 15 min) pour limiter l'agrégation de la protéine.

Seule une faible activité a été observée : 2,5 pmol /min /nmol de protéine pour le NBD1 (i. e. 72 pmol /min /mg ou $4,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) et 1 pmol /min /nmol (i. e. 30 pmol /min /mg ou $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) pour le NBD2. De plus, nous ne pouvons pas exclure que l'activité mesurée soit due à des contaminants.

Ces faibles activités pourraient être liées au fait, déjà mentionné dans l'*Introduction*, que la forme fonctionnelle des domaines NBD semble être un hétérodimère NBD1-NBD2.

Nous avons donc cherché à mettre en évidence la dimérisation des domaines NBD1 et NBD2 de Yor1p, soit par la mesure de l'activité ATPasique, soit par chromatographie d'exclusion.

Les mesures de l'activité ATPasique d'un mélange NBD1 plus NBD2 n'ont révélé aucune coopérativité entre les deux domaines. Ces expériences ont été réalisées en présence de 10 ou 100 μM d'ATP et en variant la concentration de chaque NBD de 5 à 12 μM pour le NBD1 et du 5 à 60 μM pour le NBD2. La valeur obtenue a toujours été égale à la somme des activités des deux NBD séparés.

Nous avons également cherché des indices de dimérisation des domaines par filtration HPLC sur une colonne de TSK G3000SW_{XL} (figure 45). Un mélange équimolaire des deux domaines (20 μM) a été réalisé en présence ou en absence d'ATP (50 μM) ou d'ATP- Mg^{2+} (50 μM), puis analysé sur cette colonne. Deux conditions d'élution ont été étudiées : 50 mM Tris-HCl, pH 7, 10 % glycérol et 100 mM ou 500 mM NaCl. Ni dans un cas, ni dans l'autre, une interaction entre les deux domaines n'a pu ainsi être mise en évidence.

Les domaines NBD de la protéine Yor1p ne forment donc pas de dimères suffisamment stables pour qu'ils s'associent dans des proportions mesurables pendant une chromatographie d'exclusion (Nikaido *et al.*, 1997, Schneider *et al.*, 1994, Greller *et al.*, 1999, Verdon *et al.*, 2003b).

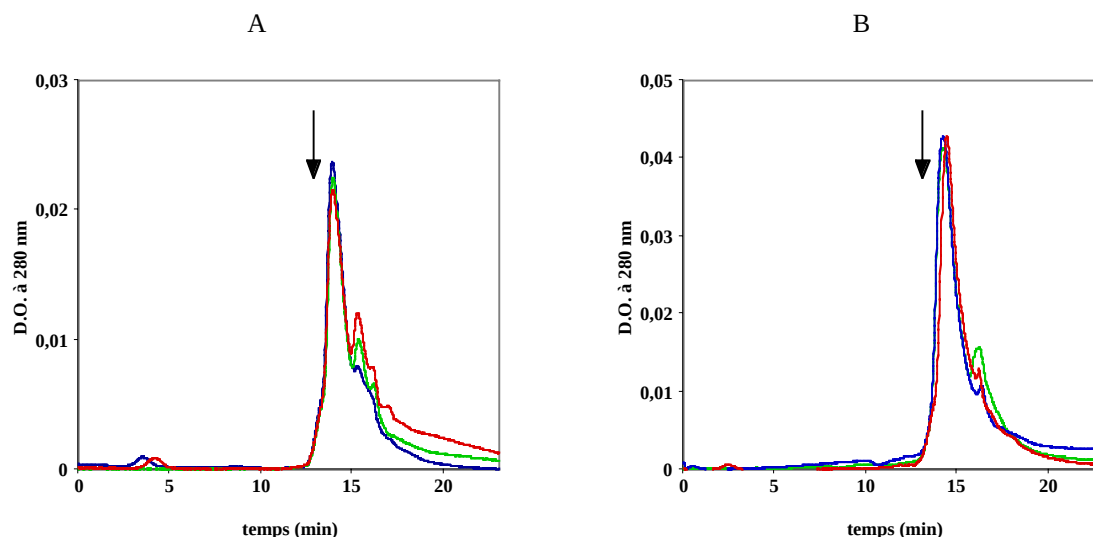


Figure 45. Filtration HPLC sur une colonne de TSK G3000SW_{XL} d'un mélange équimolaire des domaines NBD1 et NBD2 (20 μ M) en absence (courbe bleue) ou en présence de 50 μ M d'ATP (courbe verte) ou de 50 μ M d'ATP-Mg²⁺ (courbe rouge). L'élution a été effectuée dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7, 10 % glycérol (volume /volume), 100 mM NaCl (A) ou 500 mM NaCl (B) à un débit de 0,7 ml /min. Les temps de rétention ont été de 9,25 min pour la phénylalaninyl-ARNt synthétase d'*Escherichia coli* (240 kDa), de 11,2 min pour la L-lactate déshydrogénase bovine (140 kDa) et de 12,2 min pour la forme monomérique de la méthionyl-ARNt synthétase d'*Escherichia coli* (64 kDa). D'après ces valeurs, le temps de rétention attendu pour un dimère de NBD est de 13,1 min (indiqué par une flèche sur la figure).

Discussion

L'étude de l'interaction des domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p avec les dérivés de l'ATP montre que le domaine NBD1 a plus d'affinité pour les nucléotides que le NBD2. Cette propriété est partagée avec les NBD d'autres protéines de la sous-famille ABCC, comme, par exemple, MRP1 (Yang *et al.*, 2003), CFTR (Aleksandrov *et al.*, 2002) ou SUR1 (Ueda *et al.*, 1999).

De plus, les domaines NBD de Yor1p semblent capables d'interagir avec d'autres nucléotides que l'ATP. Un tel comportement a également été observé *in vitro* avec d'autres protéines ABC, comme, par exemple, Pdr5p ou Snq2p de *Saccharomyces cerevisiae* (Decottignies *et al.*, 1994, 1995) ou MalK de *Thermococcus litoralis* (Greller *et al.*, 1999). Une explication à cette faible spécificité a été proposée à la suite de l'analyse des structures de domaines NBD obtenues à haute résolution (voir l'*Introduction*). En effet, le noyau aromatique de l'ATP

n'interagit pas avec de nombreux résidus du domaine NBD et seules des liaisons π - π avec un résidu aromatique ont été mises en évidence.

En s'appuyant sur les résultats de l'étude de l'interaction des domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p avec les dérivés de l'ATP, nous avons conclu que les deux domaines, purifiés à homogénéité, étaient toujours bien structurés. Les limites que nous avons définies pour les deux domaines NBD (proches des limites naturelles de HisP) nous ont donc permis d'obtenir des protéines bien repliées et capables d'interagir avec l'ATP. Ces domaines sont donc de bons candidats pour des études structurales. De telles études vont être prochainement entreprises au laboratoire.

Les activités que nous avons mesurées pour les domaines NBD de Yor1p sont faibles par rapport à celles observées pour d'autres domaines NBD issus de transporteurs ABC. Par exemple, le NBD1+R de la protéine CFTR humaine (Annereau *et al.*, 2003) catalyse l'hydrolyse de l'ATP avec un $V_{\max}$ de $0,128 \text{ s}^{-1}$ et un K_m de $8,7 \mu\text{M}$, ce qui correspond (après calcul) à une activité de $6,9 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ à $10 \mu\text{M}$ d'ATP. Si le même calcul est effectué pour d'autres domaines NBD, on obtient des activités de $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour la protéine HlyB d'*Escherichia coli* (Benabdelhak *et al.*, 2005), de $1,3 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour Mdl1p de *Saccharomyces cerevisiae* (Janas *et al.*, 2003), de $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour MJ0796 de *Methanococcus jannaschii* (Moody *et al.*, 2002) ou de $2,4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour MalK de *Thermococcus litoralis* (Greller *et al.*, 1999).

Cependant, des activités encore plus faibles que celles que nous avons mesurées ont été rapportées pour d'autres domaines isolés de protéines ABC, comme, par exemple, le domaine NBD1 de la protéine MRP1 humaine : $V_{\max}$ de $5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ et K_m de $833 \mu\text{M}$ (Ramaen *et al.*, 2003), ce qui correspond à une activité de $5,9 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ à $10 \mu\text{M}$ d'ATP.

Dans le cas des protéines ABC où les deux domaines NBD sont identiques, l'activité ATPasique de ces domaines est plutôt conforme au modèle de Hill avec un coefficient n_H compris entre 1,5 et 2 (Davidson *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1997, Moody *et al.*, 2002, Janas *et al.*, 2003, Benabdelhak *et al.*, 2005). Cela indique la participation coopérative d'au moins deux sites (deux NBD) à la réaction catalytique. Dans le cas de Yor1p, nous n'avons pas pu détecter une telle coopérativité par des mesures de l'activité ATPasique d'un mélange NBD1 plus NBD2. De plus, l'analyse par chromatographie d'exclusion suggère que les domaines NBD de la protéine Yor1p ne forment pas de dimères stables.

On peut imaginer que les contraintes structurales imposées par la présence dans le transporteur entier des domaines transmembranaires soient indispensables à la dimérisation

des domaines NBD. On peut aussi supposer que, pour mettre en évidence une activité ATPasique d'un dimère de NBD, il sera nécessaire de produire les deux NBD sur un polypeptide unique. La contribution néguentropique d'une telle construction devrait fortement contribuer à la dimérisation des deux NBD. Une telle construction aura, en outre, l'avantage d'être sous forme soluble, donc représentera un système beaucoup plus simple que celui de la protéine entière.

Résultats

Chapitre III

Rôle des thiols dans la toxicité du sélénium

Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'*Introduction*, Ycf1p est une protéine de la même sous-famille que Yor1p. Ycf1p est responsable du transport vers la vacuole de substances organiques conjuguées au glutathion (Li *et al.*, 1996, Chaudhuri *et al.*, 1997, Falcon-Perez *et al.*, 1999) et, également, de complexes formés par le glutathion et des éléments comme le cadmium (Li *et al.*, 1997), l'arsenic, le nickel ou l'antimoine, (Ghosh *et al.*, 1999). Ycf1p transporte aussi le glutathion libre (Rebbeer *et al.*, 1998a, b) ou des composés non conjugués au glutathion comme la bilirubine (Petrovic *et al.*, 2000).

Dans un des projets du laboratoire auquel j'ai participé en construisant différentes souches de levure, nous avons montré que Ycf1p était impliquée dans la détoxification du mercure (Gueldry *et al.*, 2003). Ce travail peut être résumé ainsi : (i) la protéine Ycf1p participe à la résistance au mercure : l'inactivation du gène *YCF1* diminue la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au HgBr_2 . Par ailleurs, l'expression de ce gène à partir d'un plasmide multi-copies (pCF1) permet de rétablir la résistance au mercure d'une souche $\Delta ycf1$ (YP $\Delta ycf1$); (ii) la protéine Ycf1p transporte des adduits du mercure : l'importation de l'adduit $[\text{}^{35}\text{S}]\text{Hg}(\text{GS})_2$ est nettement plus importante par des vésicules de sécrétion isolées à partir d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* *sec6-4* surexprimant Ycf1p que par des vésicules provenant d'une souche contrôle; (iii) l'expression du gène *YCF1* est induite par le mercure.

L'ensemble de ces résultats suggère que Ycf1p joue un rôle dans la protection de la levure contre le mercure en concentrant dans la vacuole des adduits glutathion-mercure par un mécanisme semblable à celui qui permet la détoxification du cadmium.

Récemment, un effet de la protéine Ycf1p sur la toxicité du sélénite a été mis en évidence (Pinson *et al.*, 2000). Mais, de façon surprenante, dans le cas du sélénite, l'inactivation du gène *YCF1* entraîne une diminution de la toxicité, alors que c'est le contraire qui se produit avec le mercure ou le cadmium. Il nous a paru intéressant de comparer le rôle d'Ycf1p dans la réponse de la levure au sélénite et au mercure. D'autres raisons nous ont aussi incités à étudier les effets du sélénite sur la levure.

Le sélénium est un micronutriment essentiel à la santé des mammifères. Il entre, en effet, dans la composition de la sélénocystéine, un acide aminé incorporé dans un petit nombre de protéines. Des carences en sélénium sont la cause de plusieurs pathologies, comme la maladie

de Keshan, une cardiomyopathie qui touchait particulièrement les enfants d'une province de Chine dont les sols sont très pauvres en sélénium. Une alimentation pauvre en sélénium est également un facteur aggravant de plusieurs pathologies (Rayman, 2000). Dans plusieurs régions du monde, et notamment en Europe, l'apport alimentaire en sélénium se situe en dessous de l'AJR (apport journalier recommandé) (Rayman, 2004). En France, par exemple, l'apport quotidien moyen en sélénium est de 29 à 43 µg par jour et par personne, alors que la dose permettant une biosynthèse optimale des sélénoprotéines serait de 60 µg /jour pour les hommes et de 50 µg /jour pour les femmes.

En plus d'être un élément essentiel, le sélénium a aussi des propriétés prophylactiques. Plusieurs travaux suggèrent qu'un régime alimentaire enrichi en sélénium diminue de façon significative la mortalité par cancer (Clark *et al.*, 1996, Reddy *et al.*, 1997, Duffield-Lillico *et al.*, 2002). Les propriétés chimiopréventives du sélénium pourraient résulter d'une hypersensibilité au sélénium des cellules malignes ou, au contraire, d'une inhibition de la mutagenèse spontanée des cellules, ou bien encore d'un rôle protecteur exercé par les sélénoenzymes. L'apport quotidien en sélénium permettant d'assurer une action prophylactique optimale serait de 75 à 120 µg /jour (Combs *et al.*, 2001).

Au delà de telles concentrations, le sélénium devient rapidement toxique. Ainsi, l'addition de sélénite à des concentrations supérieures à quelques centaines de microgrammes par litre (10 à 30 µM) s'avère létale pour des cellules humaines en culture (McKeehan *et al.*, 1976).

Dans ce contexte, l'étude des propriétés physiologiques ou toxiques du sélénium chez les cellules eucaryotes semble donc particulièrement pertinente. Nous avons retenu la levure comme organisme modèle parce que, d'une part, cette cellule enrichie en sélénium est utilisée comme additif alimentaire à visée chimiopréventive (Rayman, 2004) et, d'autre part, la levure ne possède pas de sélénoprotéines, ce qui permet d'étudier la réponse cellulaire au sélénium sans interférences dues à d'éventuels effets sur les sélénoprotéines.

Effet des thiols sur la toxicité du sélénite pour la levure

Comme dans notre étude sur la détoxification du mercure nous avons observé que la présence de thiols diminuait nettement la toxicité de ce métal pour la levure, nous avons cherché à voir si un effet similaire se produisait dans le cas du sélénite. Des cellules de levure de la souche DTY7 ont ainsi été cultivées dans du milieu minimum contenant 0, 120 ou 400 μM de glutathion et différentes concentrations de sélénite. Les résultats présentés sur la figure 46 montrent que la présence de glutathion renforce considérablement la toxicité du sélénite. En présence de 400 μM de glutathion et de 10 μM de sélénite, les levures ne se développent plus, alors qu'en absence de glutathion, la croissance des cellules de levure est possible jusqu'à 5 mM de sélénite. Le glutathion induit donc une diminution de la concentration inhibitrice de croissance (CIC) du sélénite par un facteur supérieur à 500.

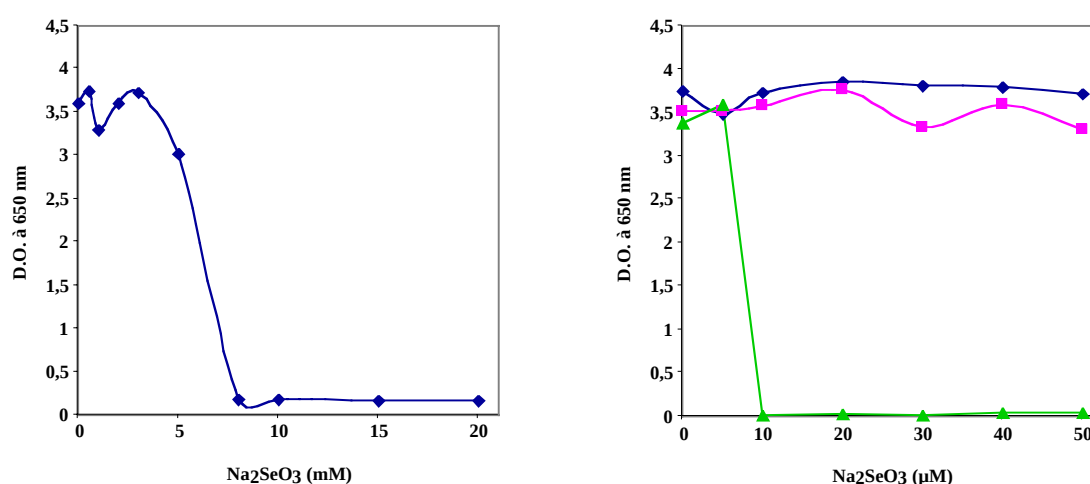


Figure 46. Effet de sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de *Saccharomyces cerevisiae* en absence (◆) ou en présence de 120 (■) ou 400 μM (▲) de glutathion. Les cellules ont été inoculées à une D.O. finale de 0,01 à 650 nm dans 3 ml de milieu MMYG-Ura-His-Leu contenant différentes concentrations de sélénite et de glutathion. Le glutathion a été ajouté dans le milieu de culture juste après l'ensemencement par les levures. Après 18 h d'incubation à 30°C, la densité optique des cultures a été mesurée à 650 nm.

Dans la figure 46 à droite, aucune inhibition de croissance n'est visible à 120 μM de glutathion, même en présence de 50 μM de sélénite, alors qu'à 400 μM de glutathion les cellules ne poussent plus dès une concentration de 10 μM de sélénite. Nous avons donc cherché la concentration minimale de glutathion provoquant une inhibition de la croissance des levures, à une concentration de sélénite de 10 μM . Les résultats présentés dans la

figure 47 montrent une apparition abrupte de la toxicité du sélénite ($10\ \mu\text{M}$) entre 150 et $200\ \mu\text{M}$ de glutathion.

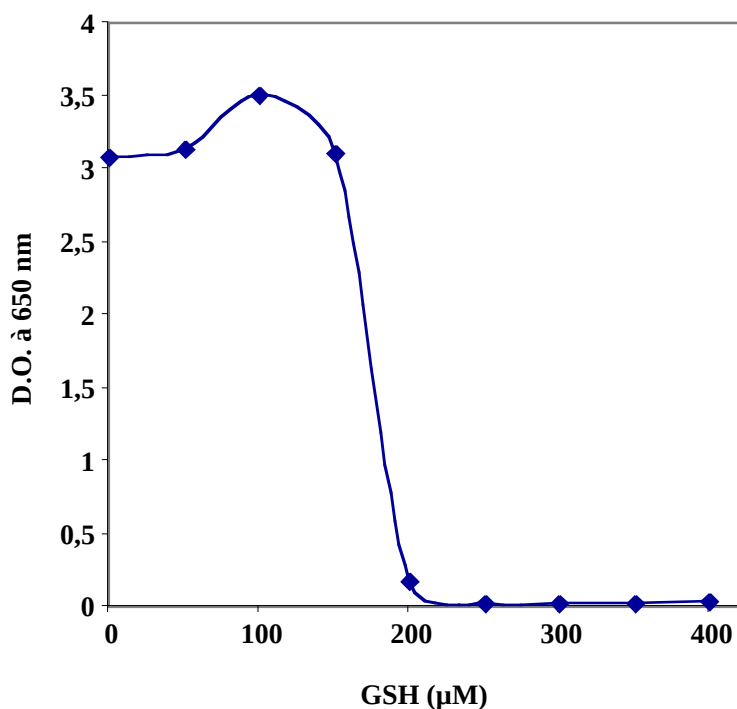


Figure 47. Effet du glutathion sur la toxicité du sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules ont été inoculées à une D.O. finale de 0,01 à 650 nm dans 3 ml de milieu MMYG-Ura-His-Leu contenant $10\ \mu\text{M}$ de sélénite et différentes concentrations de glutathion. Le glutathion a été ajouté dans le milieu de culture juste après l'ensemencement par les levures. Après 18 h d'incubation à 30°C , la densité optique des cultures a été mesurée à 650 nm.

Pour savoir si l'exacerbation de la toxicité du sélénite provenait de la fonction thiol du glutathion, la CIC du sélénite a été déterminée en présence de $400\ \mu\text{M}$ de L-cystéine. Comme le glutathion, la cystéine accroît de façon très importante la toxicité du sélénite (figure 48). L'effet de la cystéine est même légèrement plus fort que celui du glutathion, puisque la CIC du sélénite est de $5\ \mu\text{M}$ en présence de cystéine, alors qu'elle est égale à $10\ \mu\text{M}$ en présence de glutathion.

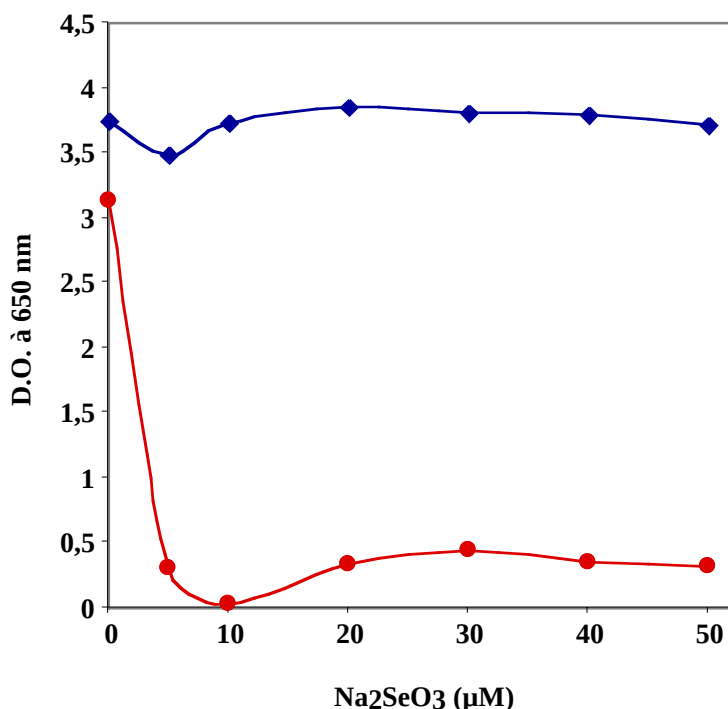
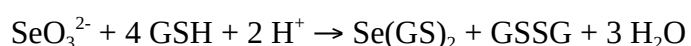


Figure 48. Effet du sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de *Saccharomyces cerevisiae* en absence (◆) ou en présence de 400 μM de cystéine (●). Les cellules ont été inoculées à une D.O. finale de 0,01 à 650 nm dans 3 ml de milieu MMYG-Ura-His-Leu contenant 400 μM de cystéine et différentes concentrations de sélénite. La cystéine a été ajoutée dans le milieu de culture juste après l'ensemencement par les levures. Après 18 h d'incubation à 30°C, la densité optique des cultures a été mesurée à 650 nm.

In vitro, le sélénite réagit spontanément avec le glutathion. Cette réaction conduit, dans une première étape, à la formation de sélénodiglutathion (Painter, 1941, Ganther, 1968, 1971) :



Pour savoir si l'adduit $\text{Se}(\text{GS})_2$ était à l'origine de l'augmentation de la toxicité du sélénite en présence de GSH, nous avons synthétisé du sélénodiglutathion et avons testé l'effet de ce composé sur la croissance des levures (figure 49). L'ajout de sélénodiglutathion (jusqu'à une concentration de 50 μM) n'a pas empêché le développement des levures. Par contre, en présence d'un excès de GSH, l'adduit $\text{Se}(\text{GS})_2$ s'est avéré toxique à une concentration de 10 μM. Ce résultat suggère que la toxicité du mélange sélénite-glutathion provient d'un composé qui, dans la réaction entre le sélénite et le glutathion, apparaît après la formation de l'adduit $\text{Se}(\text{GS})_2$.

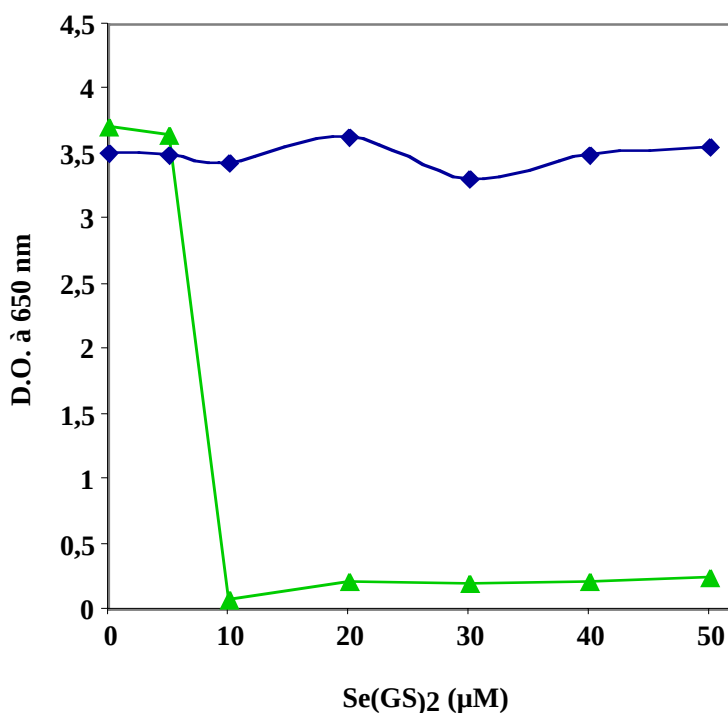


Figure 49. Effet de l'adduit sélénodiglutathion sur la croissance de la souche DTY7 de *Saccharomyces cerevisiae* en absence (♦) ou en présence de 400 μM de glutathion (▲). Les cellules ont été inoculées à une D.O. finale de 0,01 à 650 nm dans 3 ml de milieu MMYG-Ura-His-Leu contenant différentes concentrations d'adduit sélénodiglutathion et de glutathion. Le glutathion a été ajouté dans le milieu de culture juste après l'ensemencement par les levures. Après 18 h d'incubation à 30°C, la densité optique des cultures a été mesurée à 650 nm.

Rôle de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans la toxicité du sélénite pour la levure

La réduction du sélénite par un excès de glutathion aboutit spontanément, *in vitro*, à la formation de sélénium élémentaire. En effet, le sélénodiglutathion réagit avec les groupements thiols (RSH) en excès. Il est d'abord transformé en sélénopersulfide (RSSeH), puis en séléniure d'hydrogène (H₂Se) et, finalement, en sélénium élémentaire. Cette réduction du sélénite s'accompagne de cycles redox qui aboutissent à l'oxydation du glutathion par l'oxygène et à la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (O₂⁻, H₂O₂, HO•) (figure 50).

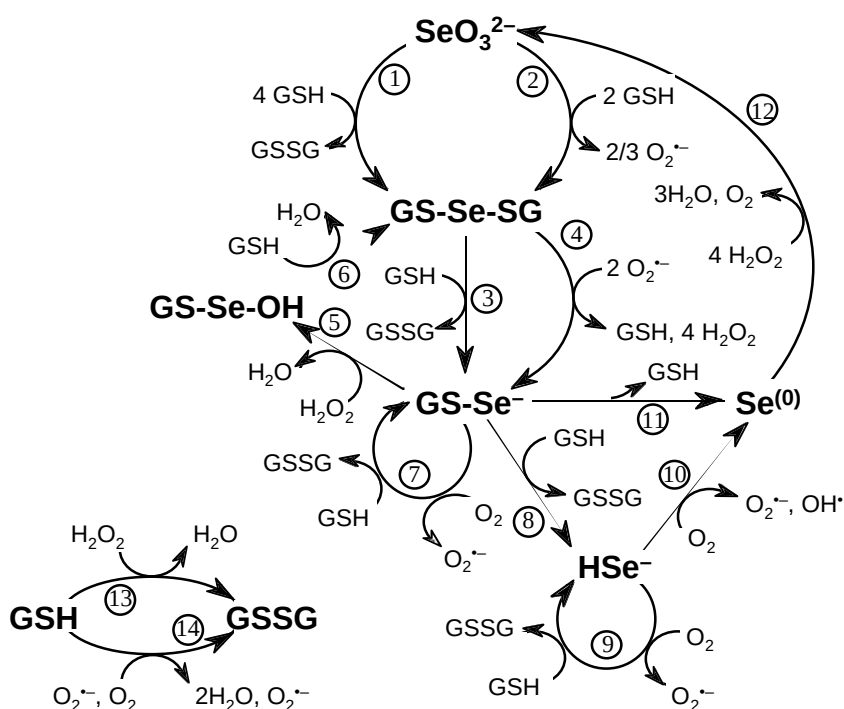


Figure 50. Cascade de réactions chimiques entre le sélénite et le glutathion. Références : Réaction n° 1 - Painter, 1941, Ganther, 1968, 1971, Sandholm et Sipponen, 1973. Réaction n° 2 - Kessi et Hanselmann, 2004. Réaction n° 3 - Ganther, 1971. Réaction n° 4 - Kessi et Hanselmann, 2004. Réaction n° 5 - Chaudiere *et al.*, 1992, Spallholz, 2001. Réaction n° 6 - Chaudiere *et al.*, 1992, Spallholz, 2001. Réaction n° 7 - Chaudiere *et al.*, 1992, Spallholz, 2001. Réaction n° 8 - Ganther, 1968. Réaction n° 9 - Shamberger, 1985. Réaction n° 10 - Kramer et Ames, 1988. Réaction n° 11 - Ganther, 1971. Réaction n° 12 - Kessi et Hanselmann, 2004. Réaction n° 13 - Kessi et Hanselmann, 2004. Réaction n° 14 - Kessi et Hanselmann, 2004.

Le rôle de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), formés lors de la réaction du sélénite avec des thiols, dans la toxicité du sélénite vis-à-vis de diverses cellules procaryotes ou eucaryotes a déjà été décrit (Kramer et Ames, 1988, Kitahara *et al.*, 1993, Shen *et al.*, 1999, Bébien *et al.*, 2002). Pour savoir si de tels ROS étaient également impliqués dans l'exacerbation par le glutathion de la toxicité du sélénite vis-à-vis de la levure, plusieurs expériences ont été réalisées.

Tout d'abord, nous avons mesuré la production d'ions superoxyde dans nos conditions de culture en utilisant comme réactif le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS), un colorant tétrazolium dont la forme réduite (le formazan) absorbe à 490 nm. Nous avons choisi ce réactif car il peut être utilisé au pH du milieu de culture (pH 5,9), contrairement à la luciférine ou au luminol qui nécessitent des pH basiques. En présence de glutathion et de sélénite, la réduction du

MTS est nettement plus importante qu'en présence de glutathion seul (figure 51). De plus, l'addition de superoxyde dismutase entraîne une nette diminution du signal, ce qui confirme la génération d'ions superoxyde pendant la réaction entre le sélénite et le glutathion. La production des ions superoxyde est maximale au bout de 90 minutes, diminue ensuite et devient faible au bout de 2 heures.

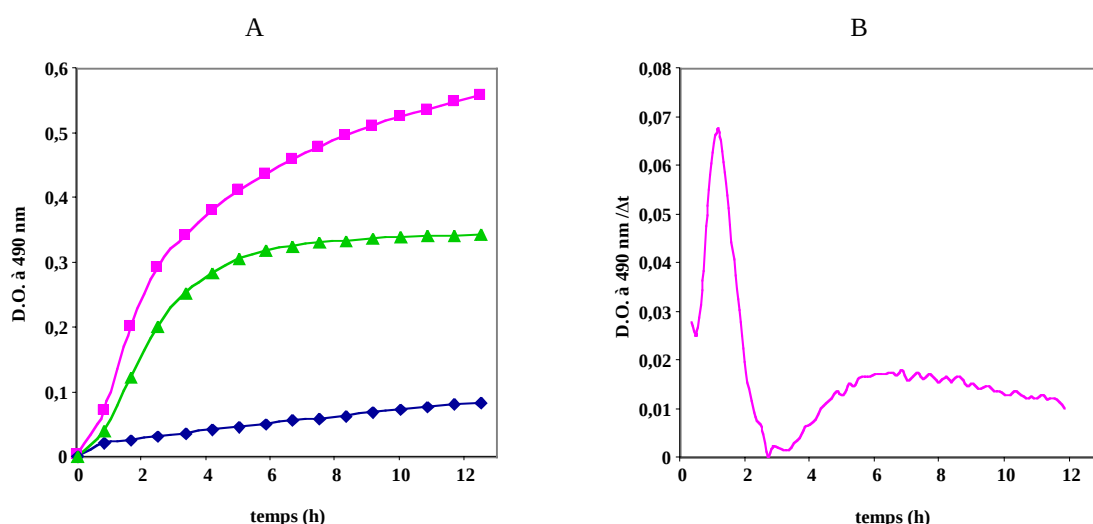


Figure 51. Réduction du MTS. A. Réduction du MTS (190 μ M) dans du milieu MMYG-Ura-His-Leu contenant soit 200 μ M de glutathion ($\blacklozenge$), soit 200 μ M de glutathion et 10 μ M de sélénite ($\blacksquare$), soit 200 μ M de glutathion, 10 μ M de sélénite et 250 U/ml de superoxyde dismutase ($\blacktriangle$). B. Production des ions superoxyde au cours de temps. Pour évaluer la production d'ions superoxyde, la différence entre la courbe enregistrée en absence (A, $\blacksquare$) et celle enregistrée en présence de SOD (A, $\blacktriangle$) a été calculée. Cette différence représente la part de la réduction du MTS due aux ions superoxyde. La dérivée de cette différence est présentée sur la figure. Elle indique la vitesse de production des ions superoxyde à chaque instant.

Comme la génération de ROS est un phénomène transitoire s'étalant sur environ 2 heures, si la toxicité du mélange sélénite-glutathion provient des ROS, elle doit être limitée dans le temps. Nous avons donc déterminé l'évolution de la toxicité d'un mélange sélénite-glutathion au cours du temps. Au temps zéro, un milieu minimum contenant 10 μ M de sélénite a été supplémenté avec 200 μ M de glutathion. Il a ensuite étéensemencé à différents temps, à une D.O. de 0,01 à 650 nm, par des levures de la souche DTY7. Les densités optiques des cultures ont été mesurées 19 heures après. Les résultats présentés sur la figure 52 montrent une inhibition de la croissance des cellules dans les tubesensemencés pendant les deux premières heures suivant l'addition de GSH dans le milieu de culture. Après ce délai, il n'y a plus d'inhibition. Ce résultat indique que la toxicité du mélange sélénite-GSH est due à des composés transitoires formés pendant la réaction entre le sélénite et le GSH. On peut

également remarquer que la période pendant laquelle le mélange sélénite-glutathion est toxique correspond à la période où il y a une production importante des dérivés réactifs de l'oxygène.

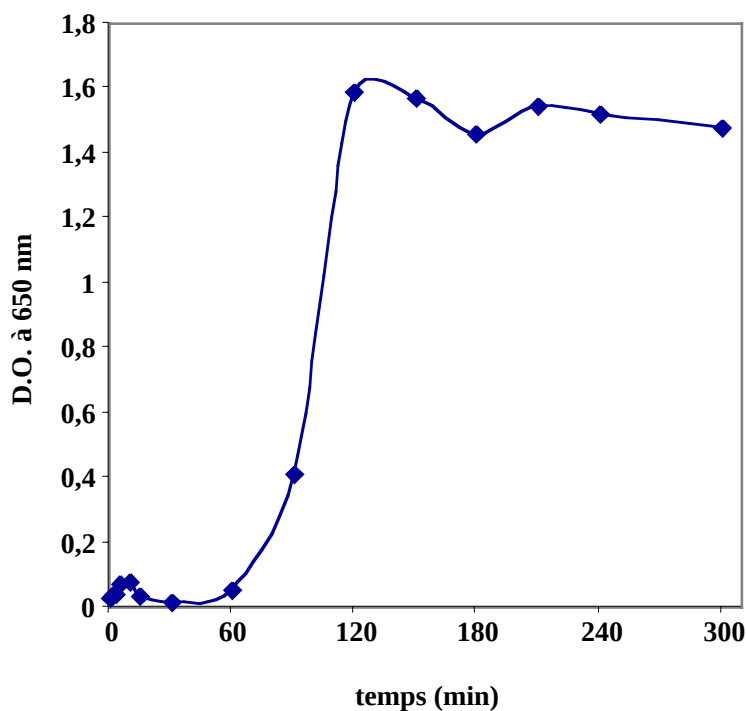


Figure 52. Evolution, en fonction du temps, de l'effet d'un mélange sélénite-glutathion sur la croissance de la souche DTY7 de *Saccharomyces cerevisiae*. Au temps zéro, du sélénite (10 μM) et du glutathion (200 μM) ont été ajoutés au milieu de culture MMYG-Ura-His-Leu. L'ensemencement par les levures, à une D.O. finale de 0,01 à 650 nm, a été réalisé à différents temps après l'addition du sélénite et du glutathion. Après 19 heures d'incubation à 30°C, les densités optiques des cultures ont été mesurées à 650 nm.

La production d'ions superoxyde dans un mélange sélénite-glutathion est inhibée par la présence de cuivre et, dans une moindre mesure, par celle de zinc (Davis et Spallholz, 1996). Si la toxicité provient des ions superoxyde, elle doit être diminuée par l'ajout de cuivre ou de zinc. Nous avons donc évalué la toxicité du sélénite en présence de 200 μM de glutathion et de concentrations de cuivre et de zinc (jusqu'à 50 μM) supérieures à celles déjà présentes dans le milieu minimum MMYG (0,25 μM et 2,5 μM , respectivement). L'ajout de cuivre entraîne une forte diminution de la toxicité du mélange sélénite-glutathion (figure 53). Son effet est mesurable dès 1 μM , une concentration très inférieure aux concentrations de sélénite (50 μM) et de glutathion (200 μM) utilisées. Un effet protecteur du zinc a également été observé, mais à des concentrations supérieures à 10 μM .

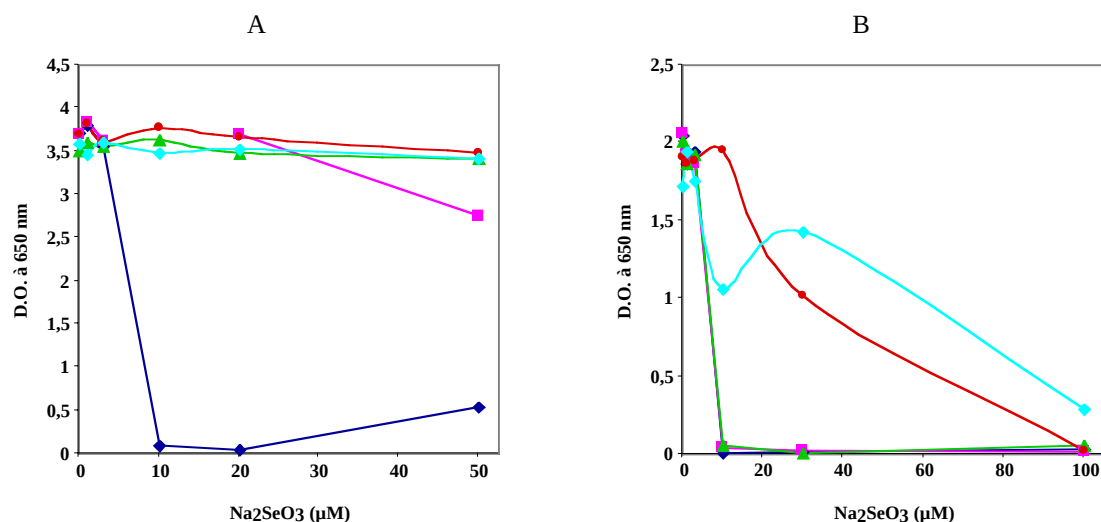


Figure 53. Effet de sélénite sur la croissance de la souche DTY7 de *Saccharomyces cerevisiae* en présence de 200 μM de glutathion et en absence (◆) ou en présence de CuSO_4 (A) ou de ZnSO_4 (B) à des concentrations finales de 1 μM (■), 3 μM (▲), 10 μM (●) ou 50 μM (◆). Les cellules ont été inoculées à une D.O. finale de 0,01 à 650 nm dans 3 ml de milieu MMYG-Ura-His-Leu contenant 200 μM de glutathion et différentes concentrations de sélénite et de CuSO_4 ou de ZnSO_4 . Le glutathion a été ajouté dans le milieu de culture juste après l'ensemencement par les levures. Après 18 h d'incubation à 30°C, la densité optique des cultures a été mesurée à 650 nm.

Discussion

L'exacerbation par les thiols de la toxicité du sélénite a déjà été observée dans le cas de nombreuses cellules mammifères, mais dans une proportion nettement moins forte que celle que nous observons ici avec la levure (Batist *et al.*, 1986, Yan *et al.*, 1991). Une explication possible est que les milieux de culture utilisés pour la croissance des cellules eucaryotes contiennent déjà des dérivés thiolés (cystéine, albumine) à des concentrations assez élevées. La pré-existence de ces thiols amoindrirait par conséquent les effets observés en réponse à l'addition d'un nouveau composé thiolé comme le glutathion.

La production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) semble à l'origine de l'hypertoxicité du mélange sélénite-glutathion vis-à-vis de la levure puisque l'addition de cuivre ou de zinc, qui inhibent la production de ROS (Davis et Spallholz, 1996), diminue considérablement la toxicité du mélange sélénite-glutathion. L'implication de ROS dans la toxicité du sélénite vis-à-vis de différents types cellulaires a déjà été suggérée par de nombreuses expériences. Ces expériences montrent notamment que l'addition de sélénite à des cellules en culture provoque

un stress oxydant à l'intérieur des cellules (Kramer et Ames, 1988, Kitahara *et al.*, 1993, Yan et Spallholz, 1993, Shen *et al.*, 1999, Bébien *et al.*, 2002).

Notre intérêt pour le sélénite a été initialement motivé par les travaux de Pinson *et al.* (2000) montrant qu'une inactivation d'*YCF1* accroissait la résistance de la levure au sélénite. Ces auteurs ont suggéré que (i) Ycf1p transport le sélénium vers la vacuole sous forme d'un adduit $\text{Se}(\text{GS})_2$. (ii) En transportant l'adduit, Ycf1p empêche le recyclage du glutathion entrant dans sa composition. Le transport induit donc une baisse de la concentration cytoplasmique de glutathion. (iii) La baisse de la concentration cytoplasmique de glutathion entraîne la toxicité du sélénite. Nos résultats permettent de proposer une autre hypothèse de travail pour expliquer l'effet paradoxal de l'inactivation d'*YCF1*. En effet, dans le cytoplasme, il existe des mécanismes permettant la détoxification du sélénite en plusieurs étapes : (i) conversion du sélénodiglutathion et du sélénopersulfide en H_2Se par les glutathion réductase et thioredoxine réductase, (ii) transformation du H_2Se en sélénométhionine, qui est un composé peu toxique pour la cellule. De telles réactions n'ont peut-être pas lieu dans la vacuole. Par conséquent, le sélénodiglutathion pourrait générer davantage de ROS lorsqu'il est transporté vers la vacuole que lorsqu'il reste dans le cytoplasme. Ainsi, en transportant le sélénodiglutathion dans la vacuole, Ycf1p pourrait renforcer la toxicité du sélénite. On peut noter qu'en accord avec cette hypothèse, des levures dépourvues de vacuole résistent mieux au sélénite que des levures sauvages (Gharieb et Gadd, 1998) et que la croissance de levures en présence de fortes concentrations de sélénite s'accompagne d'une accumulation de granules de sélénium élémentaire dans la vacuole (Pinson *et al.*, 2000), ce qui indique que des réactions chimiques conduisant à la réduction du sélénium ont bien lieu dans la vacuole. Enfin, des expériences réalisées par Thanh HA DUONG au laboratoire montrent que l'import de $[\text{}^{35}\text{S}]\text{Se}(\text{GS})_2$ par des vésicules de sécrétion est nettement plus important lorsque ces vésicules sont enrichies en Ycf1p, ce qui confirme qu'Ycf1p est capable de transporter du sélénodiglutathion.

Conclusion

Malgré l'importance des protéines ABC, les informations structurales et fonctionnelles sur ces protéines sont encore incomplètes et parfois contradictoires (voir l'*Introduction*). Les niveaux cellulaires des protéines ABC étant généralement faibles, la mise au point d'un système d'expression efficace est un préalable indispensable à la production et à la purification des protéines ABC en quantités suffisantes pour des études fonctionnelles et structurales. Plusieurs systèmes d'expression ont été développés afin de permettre la surproduction des transporteurs eucaryotes entiers. Par exemple, la P-glycoprotéine et /ou la MRP1 ont été purifiées à partir de cellules cancéreuses surproductrices (Callaghan *et al.*, 1997, Mao *et al.*, 1999), de cellules d'insectes (Ramachandra *et al.*, 1998) ou de cellules des levures *Saccharomyces cerevisiae* (Mao et Scarborough, 1997) ou *Pichia pastoris* (Urbatsch *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2005). Du point de vue expérimental, l'utilisation de la levure apparaît plus intéressante que les cellules de mammifères ou d'insectes, car cet organisme peut être facilement cultivé et de grosses quantités de protéines peuvent être ainsi obtenues. De plus, certaines protéines ABC présentent des fortes ressemblances de séquence avec des protéines ABC d'autres eucaryotes. Leur étude est donc susceptible d'apporter des informations qui serviront à guider la caractérisation d'autres protéines eucaryotes.

Nous nous sommes intéressés particulièrement à deux protéines ABC de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Yor1p et Ycf1p, de la sous-famille ABCC, car celles-ci sont apparentées à des protéines humaines ayant un intérêt médical majeur (CFTR et MRP1).

Pour l'étude des protéines ABC de *Saccharomyces cerevisiae*, leur expression homologue semble un choix raisonnable. Dans ce contexte, le système développé dans le laboratoire d'A. Goffeau nous a paru bien adapté. En effet, ce système semble produire davantage de protéines fonctionnelles qu'une surproduction à partir d'un plasmide multi-copies, peut-être parce que la mutation *PDR1-3* dans le gène du facteur de transcription Pdr1p entraîne également une surproduction de protéines importantes pour le repliement et /ou la maturation des protéines ABC. De plus, ce système avait déjà été utilisé avec succès pour surproduire des protéines ABC de levure comme Pdr5p, Snq2p ou Yor1p (Decottignies *et al.*, 1994, 1995, 1998). Depuis, ce système a été utilisé également pour l'expression hétérologue d'autres protéines ABC. Ainsi, Cdr1p de *Candida albicans* (Nakamura *et al.*, 2001), CFTR humaine (Kiser *et al.*, 2001), Cdr1p et Pdh1p de *Candida glabrata* (Wada *et al.*, 2002) ont été surproduites et

étudiées à partir de ces souches de levures. Cependant, dans le cas de CFTR, une dégradation de la protéine par le protéasome a été observée, ce qui limite les possibilités de purification de cette protéine humaine à partir de la levure.

Pour la purification des protéines ABC, la chromatographie d'affinité sur des colonnes greffées avec des ions métalliques (nickel ou cobalt) a été utilisée avec succès dans plusieurs cas. Ainsi, cette technique a permis la purification de la P-glycoprotéine (Loo et Clarke, 1995b, Lerner-Marmarosh *et al.*, 1999), de MRP2 (Hagmann *et al.*, 1999), de TAP1 et TAP2 (Meyer *et al.*, 1994), de CFTR (Ramjeesingh *et al.*, 1997, Huang *et al.*, 1998), Pdr5p (Ferreira-Pereira *et al.*, 2003). Il semblait donc intéressant de pouvoir l'appliquer aux protéines que nous cherchions à exprimer dans la levure (Yor1p et Ycf1p).

Pour être purifiée par cette méthode, une protéine doit être fusionnée génétiquement à un peptide de poly-histidine. Dans tous les exemples évoqués ci-dessus, ce peptide avait été placé en C-terminal sans modifier les propriétés du transporteur. Ce n'est cependant pas toujours le cas. Ainsi, dans des expériences préliminaires, nous avons construit une souche de levure exprimant une protéine Ycf1p étiquetée avec un peptide de 6 histidines, mais cette souche résistait moins bien au mercure que la souche produisant la protéine non étiquetée.

La première étape de ce travail de thèse a consisté à modifier le gène de la protéine Yor1p de façon à ajouter une séquence codant un peptide de poly-histidine à son extrémité 3'-terminale. Le gène ainsi obtenu a ensuite été introduit dans le génome d'une souche portant la mutation *PDR1-3* dans le gène du facteur de transcription Pdr1p. L'analyse des extraits bruts des protéines membranaires, les tests de résistance à l'oligomycine et à la rhodamine B et les mesures de transport de la rhodamine B nous ont permis de conclure que les protéines Yor1p-(His)₆ et Yor1p-(His)₁₀ étaient surproduites sous forme fonctionnelle et correctement localisées dans la membrane plasmique.

La purification de protéines étiquetées par chromatographie d'affinité sur des colonnes greffées avec des ions métalliques a constitué une deuxième étape. En utilisant comme détergent le *n*-dodécyl- β -D-maltoside, un protocole permettant la solubilisation et la purification de Yor1p-(His)₁₀ a été établi après des essais systématiques. Toutefois, à la sortie de la colonne de Co²⁺, la protéine Yor1p-(His)₁₀ semble former des agrégats qui ne sont pas complètement dissociés lors d'une électrophorèse en conditions dénaturantes. L'addition de lipides d'*Escherichia coli* a provoqué une nette diminution des formes de haut poids moléculaire, mais l'activité ATPasique de l'échantillon de protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée est

restée faible (environ 3 nmol /min /mg). Étant donné que nous n'avons observé qu'une inhibition partielle de cette activité par le vanadate et que des substrats potentiels de Yor1p, comme l'oligomycine ou la rhodamine B, n'ont aucun effet sur cette activité, nous ne pouvons pas l'attribuer avec certitude à Yor1p. De plus, le rendement de la purification est diminué en présence de lipides. L'amélioration des conditions de purification semble donc indispensable si on veut caractériser davantage l'activité de la protéine purifiée, ainsi que son état d'oligomérisation. Deux stratégies sont envisageables : l'utilisation d'autres types de lipides ou d'autres détergents. Par exemple, il serait possible d'essayer de purifier la protéine Yor1p-(His)₁₀ en présence d'asolectine, de lipides de levure ou de L- α -phosphatidylcholines. Comme décrit dans le *Chapitre I*, nous avons déjà tenté de purifier et /ou solubiliser la protéine Yor1p-(His)₁₀ en présence d'autres détergents. Le *n*-octyl- β -D-glucopyranoside, le Triton X-100 ou le désoxycholate semblent capables de solubiliser partiellement la protéine Yor1p-(His)₁₀. Il reste à déterminer des conditions permettant une meilleure solubilisation de la protéine et de vérifier si ces conditions permettent également la fixation de la protéine sur la colonne de Co²⁺.

Une autre possibilité pour purifier la protéine Yor1p sous forme active pourrait consister à étiqueter cette protéine avec autre chose qu'un peptide de poly-histidine. En effet, ce peptide peut constituer, en présence d'ions divalents, un centre de nucléation induisant ainsi l'agrégation de la protéine. Nous pourrions donc envisager de produire une protéine recombinante fusionnée, par exemple, à un domaine accepteur de la biotine (domaine BAD) et de la purifier par chromatographie d'affinité sur des colonnes greffées avec de l'avidine. Une telle procédure permet également la sélection des protéines repliées correctement, car la biotinylation du domaine BAD est réalisée *in vivo*. Cette technique a été appliquée avec succès pour la purification de plusieurs protéines membranaires exprimées chez *Saccharomyces cerevisiae* comme, par exemple, de la P-glycoprotéine humaine (Howard et Roepe, 2003) ou de la Ca²⁺-ATPase de rat (Jidenko *et al.*, 2005).

Cette étude devrait être facilitée par la mesure de l'activité ATPasique de la protéine Yor1p. Les expériences réalisées avec des extraits de membrane plasmique nous ont déjà permis d'observer un $V_{\max}$ de 300 nmol /min /mg (0,8 s⁻¹) et un K_m pour l'ATP de 50 μ M. Par contre, des résultats préliminaires indiquent que Yor1p perd complètement son activité pendant la solubilisation par le *n*-dodécyl- β -D-maltoside. Il pourra donc être intéressant, avant la purification, de rechercher des conditions permettant de retrouver une protéine active.

Vu les difficultés que nous avons rencontrées pour obtenir la protéine Yor1p entière purifiée sous forme active et en grandes quantités, nous avons produit et purifié ses domaines NBD sous forme isolée. Nous les avons exprimés chez *Escherichia coli*, puis purifiés à homogénéité. Leur bon repliement a été confirmé grâce à l'étude de leur interaction avec des dérivés photo-activables ou fluorescents de l'ATP. Dans le cas de NBD2, le niveau d'expression est très élevé. Nous disposons donc de matériel permettant d'entreprendre des études structurales. Des expériences visant à obtenir des cristaux de ces domaines ont débuté au laboratoire.

La troisième partie de ce travail, a été réalisée à la suite d'études menées au laboratoire sur le rôle de la protéine Ycf1p dans la détoxification du mercure (Gueldry *et al.*, 2003). La toxicité du mercure pour la levure est nettement plus forte lorsque le gène *YCF1* est inactivé. De plus, cette toxicité dépend de la composition du milieu de culture et, en particulier, elle est fortement diminuée par la présence des composés thiolés. La protéine Ycf1p joue également un rôle dans la toxicité du sélénite, mais, dans le cas du sélénite, l'inactivation du gène *YCF1* entraîne une résistance accrue (Pinson *et al.*, 2000). La présence des composés thiolés a également des effets opposés avec le sélénite et le mercure, puisque nous avons montré que la toxicité du sélénite pour la levure était considérablement accrue par la présence de glutathion ou de cystéine.

Lors des réactions entre le sélénite et les thiols, des dérivés réactifs de l'oxygène sont générés. Leur apparition est vraisemblablement à l'origine de l'hypertoxicité du sélénite en présence des composés thiolés. En effet, l'addition de cuivre ou de zinc, qui inhibe la formation des dérivés réactifs de l'oxygène, abolit l'exacerbation par le glutathion de la toxicité de sélénite. À cause de ses capacités à réagir avec le glutathion, le sélénite est susceptible de perturber l'état redox de la cellule. Ainsi, les cycles redox accompagnant la réduction du sélénite par le glutathion pourraient contribuer aux propriétés anticarcinogéniques du sélénite. Les cellules cancéreuses sont très actives métaboliquement. Elles contiennent donc plus de glutathion que les cellules normales, ce qui pourrait les rendre plus sensibles au sélénite. Par ailleurs, l'état redox de la cellule est important pour le choix entre prolifération et apoptose (Schafer et Buettner, 2001). En modifiant cet état redox, le sélénite pourrait favoriser l'apoptose au détriment de la prolifération.

Matériels et méthodes

Matériels

Origine des réactifs

Les réactifs utilisés au cours de ce travail ont été obtenus auprès des fournisseurs indiqués ci-dessous. Les produits chimiques courants ont été commandés chez Merck ou Prolabo.

Fournisseur	Réactifs
Acros Organics	orthovanadate de sodium
Alltech	colonne Alltima C18 (5 µm, 150 × 3,2 mm)
Amersham Biosciences	ATP, <i>HMW-SDS Calibration Kit</i> , <i>LMW Electrophoresis Calibration Kit</i> , <i>HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis</i> , anticorps anti-anticorps de souris couplés à la peroxydase, <i>ECL Western Blotting Kit</i> , persulfate d'ammonium, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, DEAE Sephacel, Superdex 75, Tween 20
Amresco	Bromure d'éthidium (BET)
Avanti Polar Lipids	lipides polaires d' <i>Escherichia coli</i> , lysophosphatidylglycérol (LPG)
BioLabs	<i>NdeI</i>
Bio-Rad	Solution acrylamide /bis à 30 %, TEMED, <i>Silver Stain Plus Kit</i> , <i>Bio-Rad Protein Assay Kit</i> , colonne <i>Micro Bio-Spin</i> , colonne <i>Poly-Prep</i> , Bio-Beads® SM-2
Clontech	résine <i>BD TALON™ Metal Affinity Resin</i> , anticorps anti 6×His
Difco	tryptone, extrait de levure, bacto-peptone, <i>Yeast Nitrogen Base</i> sans acides aminés et avec sulfate d'ammonium, agar
Epicentre Technologies	<i>SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™</i>
Fluka	<i>o</i> -phénanthroline, chymostatine, antipaïne, héparine, polyéthylène glycol 4000 (PEG4000), asolectine de soja, rhodamine 101, ouabaïne
GIBCOBRL	ADN ligase du phage T4, <i>50 bp DNA Ladder</i>
Invitrogen	<i>SimplyBlue™ SafeStain</i>
Merck	NaN ₃ , imidazole, 2-mercaptéthanol, érythrosine B, CdCl ₂ , leucine, (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , KNO ₃ , SDS, Tris, urée, acide borique, NaCl, NaOH, glycérol
Millipore	unités de centrifugation <i>Amicon Ultra</i> 4 mL 10000 et 30000 MWCO
Molecular Probes	TNP-ATP
MP Biomedicals	8-azido-[α- ³² P]ATP
Perkin Elmer	[γ- ³² P]ATP, Pico-Fluor 15
Prolabo	glycine, glucose, EDTA
Promega	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS)

Qiagen	<i>QIApre Spin Miniprep Kit, QIApre Spin Maxiprep Kit, QIAquick PCR Purification Kit, 6xHis Protein Ladder</i> , anticorps anti RGS-His, résine Ni-NTA agarose
Reactifs RAL	bleu de bromophénol, éosine Y
Roche	enzymes restriction (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I), polynucléotide 5'-hydroxyle-kinase (PNK), Taq DNA polymérase, <i>DNA molecular-weight marker XIV</i> et <i>XVII</i> , Agarose LE, <i>n</i> -dodécyl-β-D-maltoside, dithiothréitol (DTT), sérumalbumine bovine (BSA), isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), <i>Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Kit</i> , CTP, GTP, UTP, trypsine (sequencing grade), fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), superoxyde dismutase
Schleicher & Schuell	nitro-cellulose
Serva	bleu de Coomassie G (Serva Blue G), Ponceau S
Sigma	oligomycine, rhodamine B, rhodamine 6G, doxorubicine, verapamil, tétracycline, fluorescéine, pCMPS (<i>p</i> -chloro-mercuriphényl sulfonate), <i>N,N'</i> -di-cyclohexyl-carbodiimide (DCC), <i>N</i> -éthylemaléimide (NEM), NTA (nitrilotriacétate), 2-desoxy-D-glucose, L-α-phosphatidylcholine (type X-E de jaune d'œuf séché et type IV-S de soja), billes de verre (lavées à l'acide, 425-600 μm), disulfate de généticine (G-418), ampicilline, chloramphénicol, bleu de Coomassie R (Brilliant Blue R), benzamidine, leupeptine, aprotinine, pepstatine A, ovomucoïde, CHAPS, désoxycholate (DOC), <i>n</i> -lauroyl-sarcosine (LS), <i>n</i> -octyl-β-D-glucopyranoside (OG), glutathion (GSH), histidine, Na ₃ SeO ₃ , Triton X-100, uracile, HEPES, acétate de lithium, thyroglobuline bovine, L-lactate deshydrogénase bovine, catalase bovine
Stratagene	<i>QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit</i> , <i>Pfu</i> DNA polymérase
Supelco	colonnes TSK-GEL G3000SW _{XL} et TSK-GEL G4000SW _{XL}
Vivascience AG	unités de centrifugation Vivaspin 20 mL, 10000 MWCO

Oligonucléotides utilisés

Les oligonucléotides 1 à 14 ont été synthétisés par OLIGO Express et les oligonucléotides 15 à 35 par MWG-Biotech AG.

N°. Nom	Séquence
1. YOR1-NOT	5'-GGG GCG GCC GCT ACA TCC TCA GTG GAC TAC-3'
2. YOR2	5'-GCT CTA GAA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CGA TCC TCT GTT CTC GAA ATC ATT-3'
3. YOR3	5'-CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA TTC TAG AGC GTA CGC TGC AGG TCG ACG-3'
4. YOR4	5'-TGA ATG AAA TGA CAA GCA GAC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3'

5. YOR5	5'-CGA GCT CGA ATT CAT CGA TGT CTG CTT GTC ATT TCA TTC A-3'
6. YOR6-XHO	5'-CGC TCG AGC CAA CAG AGC CTG AAT GAA-3'
7. YOR-EXT-1	5'-CTA GGT CTG GTA TTG TGG AAA ATG ATT TCG-3'
8. YOR-EXT-2	5'-AGA ACA GAG GAT CGC ATC ACC ATC ACC ATC-3'
9. YOR-EXT-3	5'-ACC ATC ACC ATC ACT AAT A-3'
10. YOR-EXT-4	5'-CTA GTA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG-3'
11. YOR-EXT-5	5'-GTG ATG CGA TCC TCT GTT CTC GAA ATC ATT-3'
12. YOR-EXT-6	5'-TTC CAC AAT ACC AGA C-3'
13. YOR-CF 5'	5'-TAT AAG CTT TAA CAA GGG CAT TGG TCC G-3'
14. K2	5'-CGA CTC GTC CAA CAT CAA TAC A-3'
15. YORINACT1	5'-GTA AGG ATA CAT GGG GTA AGC CAT CTG CAA GTA CTA ATA AGG CGA AAA GAT TGG CGT ACG CTG CAG GTC-3'
16. YORINACT4	5'-TTC TTG ACT AAA CAA CGT CCA TGG TGT ATC GAA TTC TGC GAC TTC ACC CTT CTC ATC GAT GAA TTC GAG-3'
17. YORAMONT2	5'-CAT TGG ATT GGG CCG TTT GCA-3'
18. YOR-NOT1	5'-GGG GCG GCC GCG ATT CGC AAG AAC TTA GAT CC-3'
19. YOR-XBA-XHO	5'-GCC TCG AGT CTA GAA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG CGA TCC TCT GTT CTC GAA ATC-3'
20. YNBD2-MUTEQ1	5'-AAA AAT ATT GAT TTT GGA TCA GGC TAC ATC CTC AGT GGA-3'
21. YNBD2-MUTEQ2	5'-TCC ACT GAG GAT GTA GCC TGA TCC AAA ATC AAT ATT TTT-3'
22. YNBD2-MUTHR1	5'-ACA ATT TTG TGT ATT GCT CGT AGA CTG AAG ACC ATT GTA-3'
23. YNBD2-MUTHR2	5'-TAC AAT GGT CTT CAG TCT ACG AGC AAT ACA CAA AAT TGT-3'
24. NBDYOR1	5'-AGA TGA TTG AAA TGC ATA TGT CTC CTG GCT TTG-3'
25. NBDYOR2	5'-TTG AAA TGA AGC CTC ATA TGG GCT TTG ATC CAA A-3'
26. NBDYOR3	5'-CTT CTC CTG GCT TTC ATA TGA AAT TGG CTT TAA A-3'
27. NBDYOR4	5'-GTT CCT CGA GCT ATT TCT CCG AAT TTT GAG AAG A-3'
28. NBDYOR5	5'-CAA ATC AGA TGA TTC ATA TGA AGC CTT CTC CTG G-3'
29. NBDYOR6	5'-GTT CCT CGA GCT ACG AAT TTT GAG AAG AGA ATT G-3'
30. CBDYOR1	5'-CCT ATA GAA AGC CCC ATA TGA CAC CTC CAG AGT C-3'
31. CBDYOR2	5'-AGC CCG AAA TGA CAC ATA TGG AGT CAT GGC CCT C-3'
32. CBDYOR3	5'-CAC CTC CAG AGT CAC ATA TGT CAA TGG GCG AAA T-3'
33. CBDYOR4	5'-ATA ACT CGA GTT AAC TTC TGT TCT CGA AAT C-3'
34. Primer Universal	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3'
35. Primer Revers	5'-AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC-3'

Souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées

Souches de <i>S. cerevisiae</i>	Génotype	Référence /fournisseur
AD12345678 (AD1-8)	MAT α , <i>PDR1-3</i> , <i>ura3</i> , <i>his1</i> , Δ <i>yor1::hisG</i> , Δ <i>snq2::hisG</i> , Δ <i>pdr5::hisG</i> , Δ <i>pdr10::hisG</i> , Δ <i>pdr11::hisG</i> , Δ <i>ycf1::hisG</i> , Δ <i>pdr3::hisG</i> , Δ <i>pdr15::hisG</i>	Decottignies <i>et al.</i> , 1998
SUPERYOR	MAT α , <i>PDR1-3</i> , <i>his1</i> , Δ <i>yor1::hisG</i> , Δ <i>snq2::hisG</i> , Δ <i>pdr5::PDR5PROM-YOR1-PDR5STOP</i> , <i>pdr10::hisG</i> , <i>pdr11::hisG</i> , <i>ycf1::hisG</i> , <i>pdr3::hisG</i>	Decottignies <i>et al.</i> , 1998
SUPERYOR Δ yor1	MAT α , <i>PDR1-3</i> , <i>his1</i> , Δ <i>yor1::hisG</i> , Δ <i>snq2::hisG</i> , Δ <i>pdr5::PDR5PROM-Δyor1::KAN^R-PDR5STOP</i> , <i>pdr10::hisG</i> , <i>pdr11::hisG</i> , <i>ycf1::hisG</i> , <i>pdr3::hisG</i>	ce travail
SUPERYOR-(His) ₆	MAT α , <i>PDR1-3</i> , <i>his1</i> , Δ <i>yor1::hisG</i> , Δ <i>snq2::hisG</i> , Δ <i>pdr5::PDR5PROM-YOR1-(His)₆-KAN^R-PDR5STOP</i> , <i>pdr10::hisG</i> , <i>pdr11::hisG</i> , <i>ycf1::hisG</i> , <i>pdr3::hisG</i>	ce travail
SUPERYOR-(His) ₁₀	MAT α , <i>PDR1-3</i> , <i>his1</i> , Δ <i>yor1::hisG</i> , Δ <i>snq2::hisG</i> , Δ <i>pdr5::PDR5PROM-YOR1-(His)₁₀-KAN^R-PDR5STOP</i> , <i>pdr10::hisG</i> , <i>pdr11::hisG</i> , <i>ycf1::hisG</i> , <i>pdr3::hisG</i>	ce travail
SUPERYOR-(His) ₁₀ E1392Q	MAT α , <i>PDR1-3</i> , <i>his1</i> , Δ <i>yor1::hisG</i> , Δ <i>snq2::hisG</i> , Δ <i>pdr5::PDR5PROM-YOR1-(His)₁₀ E1392Q-KAN^R-PDR5STOP</i> , <i>pdr10::hisG</i> , <i>pdr11::hisG</i> , <i>ycf1::hisG</i> , <i>pdr3::hisG</i>	ce travail
SUPERYOR-(His) ₁₀ H1423R	MAT α , <i>PDR1-3</i> , <i>his1</i> , Δ <i>yor1::hisG</i> , Δ <i>snq2::hisG</i> , Δ <i>pdr5::PDR5PROM-YOR1-(His)₁₀ H1423R-KAN^R-PDR5STOP</i> , <i>pdr10::hisG</i> , <i>pdr11::hisG</i> , <i>ycf1::hisG</i> , <i>pdr3::hisG</i>	ce travail
DTY7	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his6 CUP1R-3</i>	Dr. DJ Thiele (University of Michigan Medical School)

Souches d'*Escherichia coli* utilisées

Souches d' <i>Escherichia coli</i>	Génotype	Référence /fournisseur
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene
JM110	<i>rpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lacI^qΔM15</i>]	Stratagene
Rosetta(DE3) pLacI	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLacIRARE (Cam ^R <i>lacI argU argW ileX glyT leuW proL metT thrT tyrU thrU</i>)	Novagen

Plasmides utilisés

Plasmides	Génotype	Référence /fournisseur
ppΔΔLT	plasmide dérivé de pSK-PDR5PPUS (Decottignies <i>et al.</i> , 1998), avec le terminateur de transcription du gène de levure <i>CYC1</i> inséré entre les sites <i>SmaI</i> et <i>NsiI</i>	thèse Olivier Gueldry, Ecole Polytechnique, 2003
pBluescript SK+	Amp ^R <i>lacZ'</i>	Stratagene
pBS-YORCF5'	plasmide dérivé de pBluescript SK+ avec les 300 dernières pb du cadre ouvert de lecture du gène <i>YOR1</i> insérées entre les sites <i>HindIII</i> et <i>XhoI</i> .	plasmide construit au laboratoire par Olivier Gueldry
pFA6a-kanMX4	Amp ^R Kan ^R	Wach <i>et al.</i> , 1994
pYor1	Amp ^R <i>URA3 YOR1</i> plasmide dérivé de pYES2 (Invitrogen), avec le gène <i>YOR1</i> inséré entre les sites de restriction <i>SacI</i> et <i>XhoI</i>	thèse Olivier Gueldry, Ecole Polytechnique, 2003
pBS-Yor123-His ₆	plasmide dérivé de pBluescript SK+ contenant la partie 3'-terminale du gène <i>YOR1</i> , une séquence codant le motif Arg-Gly-Ser-(His) ₆ , le gène <i>KAN^R</i> (avec le promoteur et le terminateur du gène <i>TEF</i>) et la partie 5'-terminale du gène <i>PDR5</i> insérés entre les sites <i>NotI</i> et <i>XhoI</i> .	ce travail
pBS-Yor123-His ₁₀	plasmide dérivé de pBluescript SK+ contenant la partie 3'-terminale du gène <i>YOR1</i> , une séquence codant le motif Arg-Gly-Ser-(His) ₁₀ , le gène <i>KAN^R</i> (avec le promoteur et le terminateur du gène <i>TEF</i>) et la partie 5'-terminale du gène <i>PDR5</i> insérés entre les sites <i>NotI</i> et <i>XhoI</i> .	ce travail

pBS-YOR1-(His) ₁₀ -NotI-XhoI	plasmide dérivé de pBluescript SK+ avec les 555 dernières pb du cadre ouvert de lecture du gène <i>YOR1</i> -(His) ₁₀ insérées entre les sites <i>NotI</i> et <i>XhoI</i> .	ce travail
pET15blpa	Amp ^R <i>lacI</i> ^q plasmide dérivé de pET15b (Novagen) par insertion entre les sites <i>NdeI</i> et <i>BamHI</i> d'un polylinker synthétique : TATGCCCCGGGCTCGAGGGTACCCCG CGGGCGGCCGCGTCGACC contenant les sites de restriction <i>SmaI</i> , <i>XhoI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacII</i> , <i>NotI</i> et <i>Sall</i>	Guillon <i>et al.</i> , 2005

Milieux de cultures pour les bactéries

Milieu	Composition
LB	10 g /l de tryptone (Difco), 5 g /l d'extrait de levure (Difco), 10 g /l de NaCl
LB-Ampi	milieu LB avec 50 mg /l d'ampicilline
LBA	milieu LB avec 15 g /l d'agar
LBA-Ampi	milieu LBA avec 50 mg /l d'ampicilline
2xTY	16 g /l de tryptone, 10 g /l d'extrait de levure, 5 g /l de NaCl
2xTY-Ampi-Chloramphénicol	milieu 2xTY avec 50 mg /l d'ampicilline et 34 mg /l de chloramphénicol
H-TOP	10 g /l de tryptone, 8 g /l d'agar, 8 g /l de NaCl

Milieux de cultures pour les levures

Milieu	Composition
YPG	10 g /l d'extrait de levure, 20 g /l de bacto-peptone (Difco), 20 g /l de glucose
YPGA	milieu YPG avec 20 g /l d'agar
YPGA-Généticine	milieu YPGA avec 0,2 g /l de généticine G-418 (Sigma)
YPYA	10 g /l d'extrait de levure, 20 g /l de bacto-peptone, 20 g /l de glycérol, 20 g /l d'agar
MMYG	6,7 g /l de <i>Yeast Nitrogen Base</i> sans acides aminés et avec sulfate d'ammonium (Difco), 20 g /l de glucose
MMYG-Ura-His-Leu	milieu MMYG avec 50 µg /ml d'uracile, 50 µg /ml d'histidine et 50 µg /ml de leucine

Techniques générales de biochimie et de biologie moléculaire

PCR

Les amplifications par PCR ont été réalisées au moyen de l'appareil *GeneAmp PCR System* 2400 (ou 9700) de chez Perkin Elmer. Le mélange réactionnel contenait 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,7 à 25°C, 1,5 mM de MgCl₂, 0,05 mg /ml de sérumalbumine bovine (BSA), 200 µM de chaque dNTP, 1 µM de chaque oligonucléotide et 8 U de Taq DNA polymérase.

Dans le cas d'une PCR à partir d'un plasmide, la réaction a été effectuée dans 100 µl de mélange réactionnel, à partir de 40 ng d'ADN linéarisé. De la *Pfu* DNA polymérase (0,5 U) a également été ajoutée au mélange réactionnel, afin de limiter les erreurs de polymérisation. Les PCR ont été réalisées selon le programme de 30 cycles suivant : dénaturation à 94°C pendant 20 s, hybridation à 55°C pendant 30 s, élongation à 72°C pendant 1 min 30 s. La PCR s'achève par une incubation à 72°C pendant 10 min. La purification des produits de PCR a été réalisée avec le *QIAquick PCR Purification Kit* de chez Qiagen, en utilisant le protocole recommandé par le fournisseur.

Dans le cas d'une PCR à partir de cellules de levures, on prélève une colonie de levures sur une boîte de culture, puis on chauffe ces cellules pendant 1 min dans un four à micro-ondes pour les casser. On ajoute alors 24 µl de mélange réactionnel, on chauffe les échantillons à 80°C pendant 2-3 min, puis on ajoute la Taq DNA polymérase. Le fait d'ajouter cette enzyme lorsque l'échantillon est à 80°C permet d'éviter les amplifications parasites. Les PCR ont été réalisées selon le programme de 30 cycles suivant : dénaturation à 94°C pendant 15 s, hybridation à 58°C pendant 30 s, élongation à 72°C pendant 1 min 30 s. La PCR s'achève par une incubation à 72°C pendant 5 min.

Dans le cas d'une PCR réalisée pour obtenir des mutants ponctuels nous avons utilisé le *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* de chez Stratagene. La réaction se fait à partir de 50 ng d'ADN plasmidique circulaire, dans 25 µl d'un mélange réactionnel contenant 10 mM de KCl, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 2 mM de MgSO₄, 0,1 % de Triton X-100 (volume /volume), 0,1 mg /ml de sérumalbumine bovine (BSA), 200 µM de chaque dNTP, 0,7 µM de chaque oligonucléotide et 2,5 U de *PfuTurbo* DNA polymérase. Les PCR ont été réalisées selon le programme de 12 cycles suivant : dénaturation à 95°C pendant 30 s, hybridation à 50°C pendant 30 s, élongation à 68°C pendant 10 min. La PCR s'achève

par une incubation à 68°C pendant 10 min.

Séquençage de l'ADN

Le séquençage a été effectué sur de l'ADN plasmidique selon la méthode de Sanger, en utilisant le *SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™* de chez Epicentre Technologies. Les amorces étaient marquées en 5' par les fluorophores *IRDye 700* ou *IRDye 800*. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée avec le séquenceur 4200 IR² de chez Licor.

Manipulation de l'ADN

Extraction de l'ADN plasmidique des bactéries

Les mini-préparations d'ADN ont été réalisées en utilisant le protocole de Birnboim et Doly (1979) ou le *QIApre Spin Miniprep Kit* de chez Qiagen. Les préparations plus importantes ont été effectuées à partir de 100 ml de culture bactérienne en phase stationnaire, en utilisant le *QIApre Spin Maxiprep Kit* de chez Qiagen et en suivant le protocole préconisé par le fournisseur.

Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Les digestions ont été réalisées à 37°C pendant 2 h avec 2 U d'enzyme par µg d'ADN, dans le tampon adapté aux enzymes utilisées. Lors de la digestion d'ADN provenant de mini-préparations, de la RNase a été ajoutée à une concentration finale de 0,2 mg /ml.

Ligation de l'ADN

Les ligations d'ADN ont été réalisées à 14°C pendant une nuit avec de l'ADN ligase du phage T4 provenant de chez GIBCOBRL (1 U /µl). Le mélange utilisé pour la réaction avait la composition suivante : 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM ATP, avec 2 U d'ADN ligase du phage T4 par µg de vecteur de clonage.

Migration de l'ADN sur gel d'agarose

Les électrophorèses d'ADN ont été réalisées sous une tension de 10 V /cm, sur des gels d'agarose à 1 % (poids /volume), dans le tampon TBE 1x (121,15 g /l Tris, 70,04 g /l acide borique, 7,45 g /l EDTA) et en présence de 0,5 µg /ml de bromure d'éthidium. Du bleu de bromophénol (quantité finale : 0,1 % (poids /volume)) et du glycérol (10 % (volume /volume)) sont ajoutés aux échantillons avant leur dépôt sur le gel.

Précipitation de l'ADN à l'éthanol

L'ADN est précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu et 1 /10 de volume d'acétate de sodium 3 M. Après un lavage dans un volume d'éthanol absolu et séchage, l'ADN est resuspendu dans de l'eau.

Préparation de cellules compétentes d'*Escherichia coli*

Pour préparer des bactéries compétentes pour la transformation par électroporation, les cellules sont cultivées à 37°C dans du milieu 2xTY jusqu'à une D.O. d'environ 0,5 à 600 nm. Après deux lavages avec de l'eau stérile, les cellules sont resuspendues dans une solution de glycérol à 10 % (volume /volume), à raison de 20 ml de solution par litre de culture initiale. Elles sont ensuite aliquotées par 40 µl, congelées rapidement à l'aide d'azote liquide et conservées à -80°C.

Transformation des bactéries avec de l'ADN plasmidique

Les cellules compétentes (40 µl) sont mélangées avec l'ADN plasmidique (2 µl). Après une électroporation réalisée avec l'appareil *Bio-Rad Gene PulserTM* (2,5 kV, 200 Ω, 25 µF), on ajoute 1 ml de milieu 2xTY et on incube l'échantillon obtenu à 37°C pendant 30–45 min. 3 ml de milieu H-TOP sont alors ajoutés et le mélange est étalé sur une boîte LBA-Ampi, puis incubé à 37°C pendant la nuit.

Transformation des levures avec de l'ADN plasmidique

Lorsque la D.O. de la culture atteint 1 à 650 nm, les cellules de levure sont centrifugées, lavées 2 fois dans un tampon contenant de l'acétate de lithium (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M acétate de lithium, pH 7,5), puis resuspendues dans ce même tampon (à raison de 100 µl pour 30 ml de culture initiale).

Environ 2 µg d'ADN plasmidique et 200 µg d'ADN entraîneur, préalablement dénaturé pendant 5 min à 100°C, sont ajoutés à 50 µl de cellules, ainsi que 300 µl d'un tampon contenant de l'acétate de lithium et du polyéthylène glycol (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M acétate de lithium, pH 7,5, 40 % PEG4000 (poids /volume)). Le mélange est incubé pendant 45 min à 30°C, puis soumis à un choc thermique de 20 min à 42°C. Les

cellules sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 1 ml de milieu complet YPG. Après 1 h 30 min d'incubation à 30°C, elles sont centrifugées, resuspendues dans de l'eau stérile et étalées sur un milieu sélectif permettant uniquement la croissance des cellules transformées.

Analyse des protéines

Dosage protéique

Le dosage des protéines a été réalisé avec le *Bio-Rad Protein Assay kit* selon le protocole du fournisseur. Pour ce dosage, les protéines membranaires ont été diluées dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume), contenant 0,1 % de Triton X-100 (volume /volume) (pour les extraits) ou 0,1 % de DM (poids /volume) (pour les protéines purifiées). La BSA a été utilisée comme standard.

Électrophorèse de protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (Bio-Rad) dont la concentration en acrylamide a été choisie en fonction de la taille de la protéine analysée : 12 % pour les protéines de moins de 100 kDa et 10 % pour celles de plus de 100 kDa. Sauf indications contraires, avant le dépôt sur le gel, les protéines ont été dénaturées par chauffage dans du tampon Laemmli (6,25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % SDS (poids /volume), 5 % glycérol (volume /volume), 1,5 % 2-mercaptoéthanol (volume /volume), 0,5 mg /ml de bleu de bromophénol), pendant 5 min à 95°C pour les protéines cytoplasmiques ou pendant 15 min à 37°C pour les protéines membranaires. La migration s'effectue à l'aide du système *Mini-Protean II* de chez Bio-Rad dans du tampon Tris-glycine (15 g /l de Tris, 72 g /l de glycine, 5 g /l de SDS), sous une tension de 200 V. Trois marqueurs de taille sont utilisés : *6xHis Protein Ladder* (Qiagen), *HMW-SDS calibration kit* et *LMW electrophoresis calibration kit* (Amersham Biosciences).

Électrophorèse de protéines en conditions non dénaturantes (gels natifs)

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (Bio-Rad) à 10 % préparé comme décrit ci-dessus, mis à part le fait que le SDS a été omis. Avant l'application sur gel, les protéines ont été diluées dans du tampon contenant 6,25 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 5 % de glycérol (volume /volume) et 0,5 mg /ml de bleu de bromophénol. La migration s'effectue pendant 3-4 h à l'aide du système *Mini-Protean II* de chez Bio-Rad dans du tampon Tris-glycine sans SDS (15 g /l de Tris, 72 g /l de glycine) sous une tension de

200 V. Comme marqueur de poids moléculaire, nous avons utilisé le *HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis* (Amersham Biosciences).

Coloration au bleu de Coomassie

Après l'électrophorèse, le gel est plongé dans une solution contenant 1,25 g /l de bleu de Coomassie, 45 % d'éthanol (volume /volume) et 10 % d'acide acétique (volume /volume), puis dans une solution contenant 40 % d'éthanol (volume /volume) et 10 % d'acide acétique (volume /volume), puis dans une solution contenant 10 % d'acide acétique (volume /volume) et 1 % de glycérol (volume /volume). Le gel est ensuite photographié en utilisant une caméra CCIr équipée d'un zoom SR12575 (Vilber Lourmat). Une analyse densitométrique des images est réalisée en utilisant le logiciel *BIO-PROFIL Bio-1D v.10.02* (Vilber Lourmat). Finalement, le gel est séché sur un papier Whatman 3MM en utilisant un *Gel Dryer 583* de chez Bio-Rad.

Coloration au nitrate d'argent

La coloration des gels au nitrate d'argent a été réalisée avec le *Silver Stain Plus Kit* de chez Bio-Rad, en suivant le protocole indiqué par le fournisseur.

Immunodétection

Après la migration sur gel, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitro-cellulose (Schleicher & Schuell) sous l'effet d'une différence de potentiel de 15 V, dans un appareil *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad). Le transfert a été réalisé pendant 1 h. Le tampon de transfert utilisé contenait 25 mM de Tris, 192 mM de glycine, pH 8,3 et 20 % de méthanol (volume /volume).

Après transfert, les membranes ont été incubées pendant 30 min dans du tampon TBS-BSA (tampon TBS (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0,3 % BSA (poids /volume)) + 3 % BSA (poids /volume)), puis pendant 60 min dans une solution d'anticorps anti RGS-His (Qiagen) diluée à une concentration de 0,2 µg /ml dans du tampon TBS-BSA ou dans une solution d'anticorps anti 6×His (Clontech) diluée à 0,15 µg /ml dans du tampon TBS-BSA. Les membranes ont alors été lavées (trois fois 10 min) dans du tampon TBST (tampon TBS + 0,2 % de Triton X-100 (volume /volume)), puis incubées pendant 30 min dans la solution d'anticorps secondaires (anticorps anti-anticorps de souris couplés à la peroxydase, Amersham Biosciences) dilués 3000 fois dans du tampon TBST contenant 0,2 % de lait en poudre (poids /volume). Les membranes ont ensuite été lavées comme précédemment. La détection des protéines marquées a été effectuée à l'aide du *ECL Western Blotting Kit* (Amersham

Biosciences) ou du *Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Kit* (Roche) en suivant les indications des fournisseurs.

Identification par spectrométrie de masse des protéines purifiées par SDS-PAGE

Après l'électrophorèse, le gel a été coloré au bleu de Coomassie G-250 avec le *SimplyBlueTM SafeStain* de chez Invitrogen, en suivant le protocole indiqué par le fournisseur. La bande à analyser a été excisée du gel et digérée par la trypsine selon la méthode décrite par Shevchenko *et al.* (1996). Les peptides obtenus ont été analysés par la technique MALDI en utilisant un spectromètre de masse FT-ICR Bruker Apex III 70° équipé d'un aimant supraconducteur de 7,0 T. (Bruker Daltonics). Les masses moléculaires des peptides tryptiques obtenues expérimentalement ont été utilisées pour rechercher, dans la banque de données NCBI, les protéines dont ils pouvaient provenir. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Mascot (Matrix Science). Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées au Laboratoire des Mécanismes Réactionnels de l'Ecole Polytechnique (DCMR), avec la collaboration de Jean-Pierre LE CAER et de Guillaume VAN DER REST.

Filtration HPLC sur une colonne TSK-GEL

Les chromatographies d'exclusion ont été effectuées sur un système HPLC (Beckman). Les protéines ont été séparées sur des colonnes de TSK-GEL dont la nature a été choisie en fonction de la taille de la protéine analysée : TSK-GEL G3000SW_{XL} pour les protéines de moins de 100 kDa et TSK-GEL G4000SW_{XL} pour celles de plus de 100 kDa. L'élution a été effectuée dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7, 10 % glycérol (volume /volume), 100 mM NaCl, à un débit de 0,7 ml /min pour la colonne de TSK-GEL G3000SW_{XL} et de 0,5 ml /min pour la colonne de TSK-GEL G4000SW_{XL}. Lors de l'étude des domaines NBD, la concentration en glycérol dans le tampon d'élution a été variée de 0 à 20 % (volume /volume), alors que celle de NaCl a parfois été de 500 mM. La protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée a été analysée en présence de 0,1 % de DM (poids /volume). Comme marqueurs de poids moléculaire, nous avons utilisé la phénylalananyl-ARNt synthétase d'*Escherichia coli* (Hountondji *et al.*, 1987), une forme monomérique de la méthionyl-ARNt synthétase d'*Escherichia coli* (Mellot *et al.*, 1989), la thyroglobuline bovine (Sigma), la L-lactate déshydrogénase bovine (Sigma) ou la catalase bovine (Sigma).

Constructions des souches de levure

Construction de la souche SUPERYOR Δ yor1 – inactivation du gène *YOR1*

L'inactivation du gène *YOR1* dans la souche SUPERYOR a consisté à remplacer les bases 1751 à 4311 de ce gène par une cassette de résistance à la kanamycine. Pour cela, un fragment d'ADN de ~1600 pb contenant les résidus 1697 à 1750 du gène *YOR1*, le gène *KAN^R* (avec le promoteur et le terminateur du gène *TEF*) et les résidus 4312 à 4365 du gène *YOR1* a été amplifié par PCR en utilisant comme amorces les oligonucléotides YORINACT1 et YORINACT4 et comme matrice le plasmide pFA6a-kanMX4 préalablement digéré par *NotI*. Le produit de la PCR a ensuite été utilisé pour transformer la souche SUPERYOR. La sélection des clones transformés a été réalisée sur du milieu YPGA contenant 0,2 g /l de généticine G-418. L'inactivation du gène *YOR1* a été vérifiée par PCR, directement à partir de cellules, en utilisant les oligonucléotides YORAMONT2 et K2.

Construction des souches SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR -(His)₁₀

La construction des souches SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ a été réalisée par recombinaison homologue au niveau du locus *PDR5* de la souche SUPERYOR. Pour cela, la levure a été transformée avec un fragment d'ADN de ~2000 pb contenant la partie 3-terminale du gène *YOR1*, une séquence codant le motif Arg-Gly-Ser-(His)₆ ou ₁₀, le gène *KAN^R* (avec le promoteur et le terminateur du gène *TEF*) et la partie 5'-terminale du gène *PDR5*. La sélection des clones transformés a été réalisée sur un milieu contenant de la généticine.

Les détails de ce protocole, schématisés sur la figure 54, sont les suivants :

Dans une première étape, nous avons amplifié par PCR 3 fragments d'ADN partiellement chevauchants :

1. un fragment de 297 pb codant l'extrémité C-terminale de Yor1p-(His)₆. Ce fragment a été produit en utilisant comme amorces les oligonucléotides YOR1-NOT et YOR2 et comme matrice le plasmide pBS-YORCF5' préalablement digéré par *KpnI*. Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK+ qui contient les 300 dernières pb du cadre ouvert de lecture du gène *YOR1* insérées entre les sites *HindIII* et *XhoI*.
2. un fragment de 1556 pb contenant le gène de résistance à la kanamycine *KAN^R* (avec le promoteur et le terminateur du gène *TEF*). Ce fragment a été obtenu en utilisant comme

amorces les oligonucléotides YOR3 et YOR4 et comme matrice le plasmide pFA6a-kanMX4 digéré par *NotI*.

3. un fragment de 204 pb contenant la partie 5'-terminale du gène *PDR5*. Ce fragment a été produit en utilisant comme amorces les oligonucléotides YOR5 et YOR6-XHO et comme matrice le plasmide pSK-PP Δ ALT digéré par *NotI*.

Pour assembler ces trois fragments, nous avons mélangé un millième de chacun des trois produits de PCR et soumis ce mélange à une amplification de 5 cycles (dénaturation à 94°C pendant 15 s, hybridation à 58°C pendant 30 s, élongation à 72°C pendant 1 min 30 s) en absence d'oligonucléotides, puis de 26 cycles (dénaturation à 94°C pendant 15 s, hybridation à 58°C pendant 30 s, élongation à 72°C pendant 2 min 30 s) en présence de 1 μ M des oligonucléotides YOR1-NOT et YOR6-XHO.

Le fragment amplifié a alors été inséré dans le vecteur pBluescript SK+ entre les sites *NotI* et *XhoI*. La contre-sélection des plasmides non recombinants a été réalisée par digestion avec l'enzyme *EcoRV*. La séquence du fragment d'ADN introduit dans le vecteur pBluescript SK+ a été vérifiée en utilisant comme amorce l'oligonucléotide Primer Revers. Le plasmide obtenu a été appelé pBS-Yor123-His₆.

Ce plasmide, linéarisé avec les enzymes *NotI* et *XhoI*, a été utilisé pour transformer la souche de levure SUPERYOR. La sélection des clones transformés a été réalisée sur du milieu YPGA contenant 0,2 g /l de généticine G-418. Le remplacement au niveau du locus *PDR5* a été vérifié par PCR, directement à partir de cellules, en utilisant les oligonucléotides YOR-CF 5' et K2.

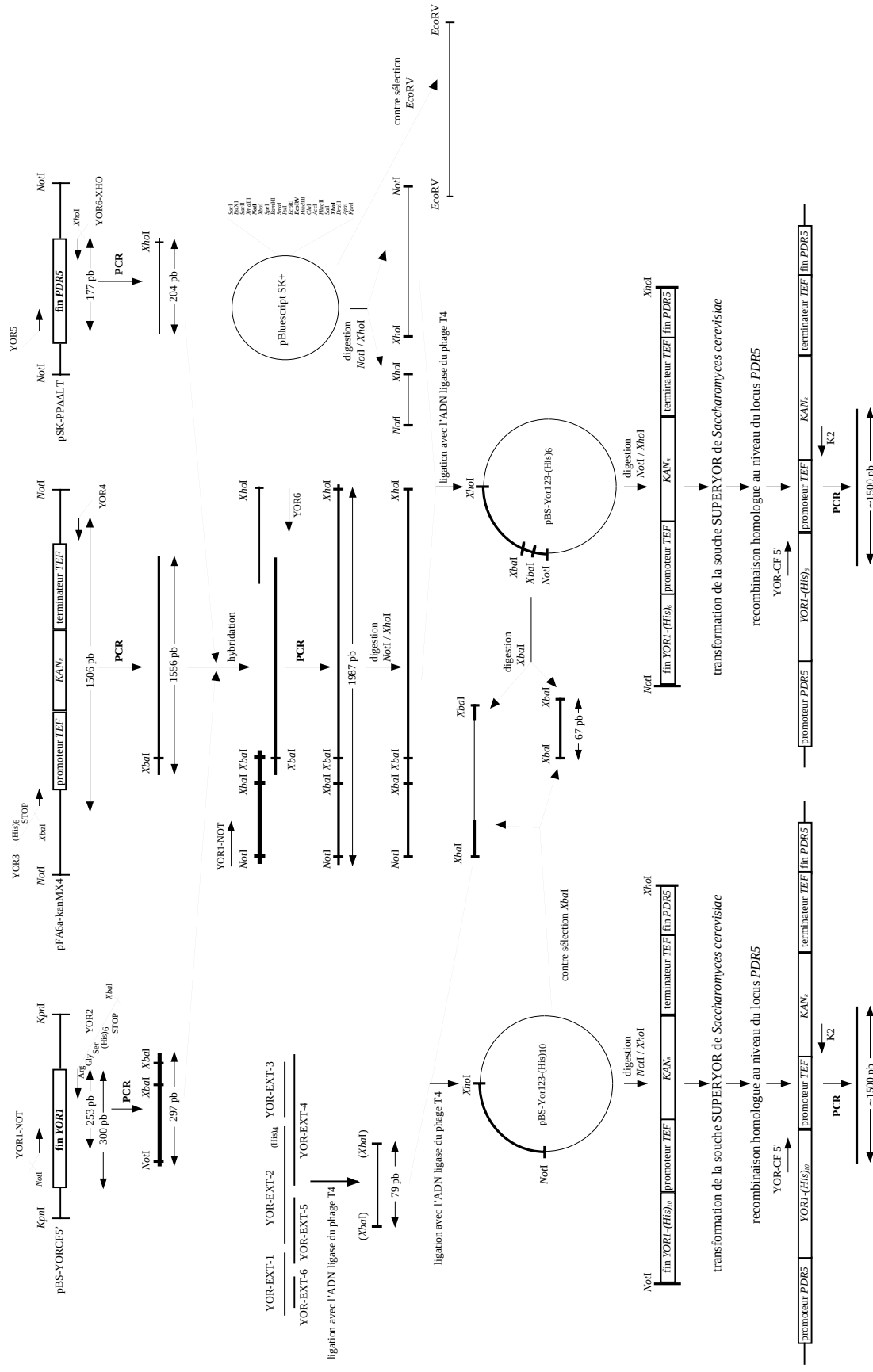
Pour construire la souche SUPERYOR-(His)₁₀, nous nous sommes appuyés sur la présence de deux sites *XbaI* dans le plasmide pBS-Yor123-His₆ : le premier, inséré au cours de la construction, est situé juste après le codon de terminaison et l'autre à ~70 pb en amont de la fin du gène codant Yor1p-(His)₆.

Dans un premier temps, un fragment d'ADN de 79 pb comprenant l'extrémité 3'-terminale du gène et la séquence codant les 10 histidines, a été construit. Cette construction a été réalisée par assemblage de 6 oligonucléotides se chevauchant (YOR-EXT-1, YOR-EXT-2, YOR-EXT-3, YOR-EXT-4, YOR-EXT-5 et YOR-EXT-6) en trois étapes : (i) phosphorylation des extrémités 5'-hydroxyle, (ii) hybridation et (iii) ligation des extrémités 5'-phosphate et 3'-hydroxyle adjacentes dans le duplex d'ADN formé. La réaction de phosphorylation a été réalisée avec 0,5 U de polynucléotide 5'-hydroxyle-kinase (PNK) de chez Roche, à 37°C, pendant 45 min, dans un volume final de 20 μ l d'un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl,

pH 7,6, 10 mM de MgCl_2 , 10 mM de dithiothréitol, 1 mM d'ATP et 50 pmol de chacun des oligonucléotides. Pour éviter la formation de concatémères au cours de la ligation, les oligonucléotides correspondant aux extrémités 5' du fragment (YOR-EXT-1 et YOR-EXT-4) n'ont pas été phosphorylés. L'hybridation a été réalisée en chauffant l'échantillon à 95°C pendant 2 min, puis en le refroidissant lentement jusqu'à 37°C. La ligation a été réalisée comme décrit ci-dessus, à 37°C, pendant 2 h.

Ce fragment ainsi assemblé a été substitué à la partie 3'-terminale du gène *YOR1-(His)₆* porté par le plasmide pBS-Yor123-*His₆*. Ce plasmide a été préalablement purifié à partir de la souche d'*Escherichia coli* JM110 (*dam*), pour permettre ensuite sa digestion par l'enzyme *XbaI* (un des sites *XbaI* est méthylé dans une souche *dam*⁺, ce qui empêche sa coupure par *XbaI*). La contre-sélection des plasmides non recombinants a été réalisée par digestion avec l'enzyme *XbaI*. La séquence du plasmide sélectionné (pBS-Yor123-*His₁₀*) a été vérifiée en utilisant comme amorce l'oligonucléotide Primer Revers.

Comme dans le cas de Yor1p-(*His*)₆, la souche de levure produisant la protéine Yor1p-(*His*)₁₀ a été obtenue par recombinaison homologue. Pour cela, la souche SUPERYOR a été transformée avec le plasmide pBS-Yor123-*His₁₀* digéré par *NotI* et *XhoI*. La sélection des clones transformés a été réalisée sur du milieu YPGA contenant 0,2 g/l de généticine G-418. Le remplacement au niveau du locus *PDR5* a été vérifié par PCR, directement à partir de cellules, en utilisant les oligonucléotides YOR-CF 5' et K2.

Figure 54. Construction des souches SUPERYOR-(His)₆ et SUPERYOR-(His)₁₀ de *Saccharomyces cerevisiae*.

Construction de la souche SUPERYOR -(His)₁₀ H1423R – mutation du résidu His 1423 de la protéine Yor1p-(His)₁₀

Le mutant ponctuel H1423R de la protéine Yor1p-(His)₁₀ a été obtenu par mutagenèse dirigée par PCR, à l'aide du *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene. La réaction a été réalisée en utilisant le plasmide pBS-Yor123-His₁₀ comme matrice et les oligonucléotides YNBD2-MUTHR1 et YNBD2-MUTHR2 comme amorces. Le produit de la réaction a été digéré par 10 U d'enzyme *DpnI* pendant 1 h à 37°C, puis utilisé pour transformer la souche d'*Escherichia coli* XL1-Blue. Le plasmide mutant obtenu a été appelé pBS-Yor123-His₁₀-MutHR. Sa séquence a été vérifiée à l'aide de l'oligonucléotide Primer Revers.

Pour introduire la mutation dans la levure, la souche SUPERYOR a été transformée avec le fragment *NotI-XhoI* du plasmide pBS-Yor123-His₁₀-MutHR. La sélection des clones transformés a été réalisée sur du milieu YPGA contenant 0,2 g/l de généticine G-418. Le remplacement au niveau du locus *PDR5* a été vérifié par PCR, directement à partir de cellules, en utilisant les oligonucléotides YOR-CF 5' et K2.

Construction de la souche SUPERYOR-(His)₁₀ E1392Q – mutation du résidu Glu 1392 de la protéine Yor1p-(His)₁₀

Le plasmide pBS-Yor123-His₁₀ ne code que pour les acides aminés 1393 à 1488 de la protéine Yor1-(His)₁₀. Il ne peut donc pas être utilisé pour mutagéniser la position 1392. Pour réaliser cette mutagenèse, nous avons donc construit un nouveau plasmide, pBS-YOR1-(His)₁₀-NotI-XhoI, codant les 185 derniers acides aminés de la protéine Yor1-(His)₁₀.

Dans un premier temps, nous avons amplifié par PCR un fragment d'ADN de 585 pb correspondant à l'extrémité C-terminale de Yor1-(His)₁₀. Ce fragment a été produit en utilisant comme amorces les oligonucléotides YOR-NOT1 et YOR-XBA-XHO et comme matrice le plasmide pYor1. Le produit de PCR a ensuite été introduit dans le plasmide pBluescript SK+ entre les sites *NotI* et *XhoI*. La contre-sélection des plasmides non recombinants a été réalisée par digestion avec l'enzyme *EcoRV*. La séquence du plasmide obtenu, pBS-YOR1-(His)₁₀-NotI-XhoI, a été vérifiée, en utilisant comme amorces les oligonucléotides Primer Revers et Primer Universal.

La mutation E1392Q a alors été introduite dans ce plasmide à l'aide des oligonucléotides YNBD2-MUTEQ1 et YNBD2-MUTEQ2 en utilisant la même procédure que celle décrite ci-

dessus pour la mutation H1423R. Le plasmide mutant obtenu a été appelé pBS-YOR1-(His)₁₀-NotI-XhoI Mut EQ. Sa séquence a été vérifiée à l'aide des oligonucléotides Primer Revers et Primer Universal.

Le fragment *NotI-XbaI* a été ensuite excisé du plasmide pBS-YOR1-(His)₁₀-NotI-XhoI Mut EQ et utilisé pour remplacer la partie 3'-terminale du gène *YOR1*-(His)₆ porté par le plasmide pBS-Yor123-His₆. Ce plasmide a préalablement été purifié à partir de la souche d'*Escherichia coli* XL1-Blue (*dam*⁺). Ainsi, la coupure par *XbaI* du site localisé à l'intérieur du gène *YOR1* n'a pas lieu. L'enzyme coupe donc ce plasmide uniquement au niveau du site se trouvant entre la fin du gène *YOR1* et le promoteur *TEF*.

Pour introduire la mutation E1392Q dans le génome de la levure, la souche SUPERYOR a été transformée avec le fragment *NotI-XhoI* du plasmide pBS-Yor123-His₁₀-MutEQ. La sélection des clones transformés a été réalisée sur du milieu YPGA contenant 0,2 g/l de généticine G-418. Le remplacement au niveau du locus *PDR5* a été vérifié par PCR, directement à partir de cellules, en utilisant les oligonucléotides YOR-CF 5' et K2.

Clonage des domaines NBD de la protéine Yor1p dans le vecteur pET15blpa

Les différents fragments d'ADN visant à produire chez *Escherichia coli* les domaines NBD1 et NBD2 de la protéine Yor1p ont été amplifiés par PCR à partir du plasmide pYor1. Les amorces utilisées pour ces amplifications sont indiquées dans le tableau 8.

Tableau 8. Amorces utilisées pour les amplifications par PCR des différents fragments d'ADN visant à produire chez *Escherichia coli* les domaines NBD1 et NBD2.

Construction n° :	Résidus de la protéine Yor1p codés par les fragments amplifiés	Oligonucléotides utilisés
1. – NBD1	521-815	NBDYOR1 et NBDYOR4
2. – NBD1	523-815	NBDYOR2 et NBDYOR4
3. – NBD1	527-815	NBDYOR3 et NBDYOR4
4. – NBD1	519-815	NBDYOR5 et NBDYOR4
5. – NBD1	519-813	NBDYOR5 et NBDYOR6
1. – NBD2	1202-1477	CBDYOR1 et CBDYOR4
2. – NBD2	1205-1477	CBDYOR2 et CBDYOR4
3. – NBD2	1209-1477	CBDYOR3 et CBDYOR4

Les fragments d'ADN amplifiés ont ensuite été introduits entre les sites *NdeI* et *Sall* du plasmide pET15b_{lpa}. Pour cela, les produits de PCR ont été clivés par les enzymes de restriction *NdeI* et *Sall*, et le vecteur par *NdeI* et *XhoI*. Les séquences de tous les plasmides finalement obtenus ont été vérifiées à l'aide des oligonucléotides Primer Revers et Primer Universal.

Autres méthodes utilisées

Tests de résistance des cellules de levure à différents produits toxiques

Tests de résistance sur milieu solide

Les cellules, cultivées pendant une nuit dans du milieu YPG à 30°C, ont été diluées dans de l'eau de façon à obtenir une D.O. finale de 1, 0,1 ou 0,01 à 650 nm. Des gouttes de 5 µl ont été déposées sur des boîtes de YPGA contenant des concentrations croissantes de différents produits toxiques ou sur des boîtes de YPYA contenant des concentrations croissantes d'oligomycine. Les boîtes ont été analysées après 2 jours de culture à 30°C.

Tests de résistance en milieu liquide

Les cellules de levure de la souche DTY7 ont été cultivées à 30°C jusqu'à une D.O. d'environ 0,7 à 650 nm dans du milieu MMYG-Ura-His-Leu. Elles ont ensuite été utilisées pour ensemercer, à une D.O. finale de 0,01 à 650 nm, 3 ml de milieu contenant différentes concentrations de sélénite ou de Se(GS)₂. Les thiols (glutathion ou cystéine) ont été ajoutés dans le milieu de culture juste après l'ensemencement. Après une nuit d'incubation à 30°C, la D.O. de chaque tube a été mesurée à 650 nm.

Dans l'expérience réalisée pour déterminer l'évolution au cours du temps de la toxicité d'un mélange sélénite-glutathion, 50 ml de milieu MMYG-Ura-His-Leu ont été supplémentés avec 10 µM de sélénite et 200 µM de glutathion. Le mélange a été aliquoté à raison de 3 ml par tube de culture, puis ensemençé à différents temps avec des levures de façon à obtenir une D.O. finale de 0,01 à 650 nm. Après 19 h d'incubation à 30°C, les D.O. des cultures ont été mesurées à 650 nm.

Synthèse de l'adduit sélénodiglutathion

Le sélénodiglutathion a été synthétisé au laboratoire par Thanh HA DUONG, de la façon suivante : Le glutathion (2,5 mM) a été mélangé avec du sélénite (625 μ M) dans un volume final de 100 μ l. Après 15 min d'incubation à 4°C, 1,8 μ l d'acétate de sodium à 1 M, pH 4,5 a été ajouté et le mélange a été séparé par chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne Alltima C18 (5 μ m, 150 $\times$ 3,2 mm), dans 0,05 % d'acide acétique (volume /volume), à 0,4 ml /min. La sortie des différents composés a été repérée en mesurant la D.O. à 214 nm. Les temps de rétention du sélénite, du GSH et du Se(GS)₂ ont été de 2,1, 5 et 12 min, respectivement. Le Se(GS)₂ collecté dans le pic sorti à 12 min a été lyophilisé. Une analyse par spectrométrie de masse de ce produit été réalisée sur un spectromètre de masse VG Quattro II (Micromass, UK), au Laboratoire des Mécanismes Réactionnels de l'Ecole Polytechnique (DCMR), avec la collaboration de Françoise ROGALEWICZ-GILARD.

Transport de la rhodamine B par des cellules de levure

Le transport de la rhodamine B par des cellules intactes a été effectué comme décrit précédemment (Decottignies *et al.*, 1998), avec quelques modifications. Les cellules ont été cultivées à 30°C dans 50 ml de milieu YPG, jusqu'à une D.O. d'environ 1 à 650 nm. Elles ont ensuite été lavées 3 fois avec 20 ml de tampon 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,0 et resuspendues dans le même tampon contenant 50 mM de 2-désoxy-D-glucose, pour obtenir une D.O. finale de 2,5 à 650 nm. Après 1 h d'incubation à la température ambiante, la rhodamine B a été ajoutée à une concentration finale de 100 μ g /ml et l'incubation a été continuée pendant 2 h. Les cellules ont alors été lavées 6 fois avec 20 ml de tampon 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,0 et resuspendues dans ce tampon à une D.O. de 5 à 650 nm. Du glucose a ensuite été ajouté à une concentration finale de 200 mM et des échantillons de 1,2 ml ont été prélevés au cours du temps, puis centrifugés (2 min à 5000 g). Les culots ont été resuspendus dans 1,2 ml de tampon 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,0. La fluorescence de la rhodamine B présente dans les surnageants et les culots a été mesurée en utilisant un spectrofluorimètre équipé d'une lampe au xénon de 450 W (Osram), de deux monochromateurs HRS-2 (Jobin et Yvon) et d'un photomultiplicateur EMI QA. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient de 555 nm et de 575 nm, respectivement.

Préparation des lipides

Les lipides polaires de *Saccharomyces cerevisiae* ont été extraits à partir de la souche AD1-8 selon la méthode décrite par Hanson et Lester (1980). Les cellules ont été cultivées à 30°C dans 250 ml de milieu YPG, jusqu'à une D.O. d'environ 3 à 650 nm. Après un lavage avec 100 ml d'eau, les cellules ont été resuspendues dans 5 ml d'un mélange éthanol-eau 4 :1 (vol /vol) et les lipides ont été extraits par une incubation de 15 min à 100°C. Après centrifugation (5 min à 20000 g), le surnageant contenant ces lipides a été récupéré et une deuxième extraction a été effectuée à partir du culot. Après lyophilisation, les lipides ont été resuspendus à une concentration de 20 mg /ml, dans du chloroforme. Ils ont été conservés à -20°C.

Les lipides polaires d'*Escherichia coli* ont été fournis par Avanti Polar Lipids sous forme d'une solution à 20 mg /ml dans du chloroforme.

Les L- α -phosphatidylcholines de jaune d'oeuf séché (type X-E) et de soja (type IV-S), ainsi que l'asolectine ont été fournis par Sigma ou Fluka sous forme solide. Ces lipides ont été dissous dans du chloroforme de façon à obtenir une concentration finale de 20 mg /ml.

Avant utilisation, les lipides ont été séchés sous un flux d'azote, puis resuspendus à 20 mg /ml dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Ils ont ensuite été soniqués à 25°C pendant 1 min afin d'obtenir une solution claire.

Extraction des protéines membranaires

Préparation d'un extrait brut - protocole pour des petites quantités (< 1 l de culture)

Les levures ont été cultivées à 30°C dans du milieu YPG jusqu'à une D.O. d'environ 3 à 650 nm, récoltées par centrifugation et lavées avec de l'eau à 4°C (à une D.O. de 10 à 650 nm). Le culot a été ensuite resuspendu dans du tampon de cassage (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume)) contenant 10 mM de 2-mercaptéthanol, puis aliquoté dans des tubes à fond conique par fractions d'environ 1,5 g de cellules. Après avoir été centrifugées, les cellules ont été gardées à -20°C ou utilisées immédiatement.

Pour un échantillon de 1,5 g de cellules, le cassage a été réalisé en ajoutant 1,5 ml de tampon A (tampon de cassage contenant 10 mM de 2-mercaptéthanol et un mélange d'inhibiteurs de protéases (anti-protéases) : 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 0,5 μ g /ml d'aprotinine, 0,5 μ g /ml d'antipain, 0,5 μ g /ml de chymostatine, 0,5 μ g /ml de leupeptine, 0,5 μ g /ml de pepstatine A, 0,1 mg /ml de benzamidine, 1 μ g /ml d'o-phénanthroline et 6 μ g /l

d'ovomucoïde) et 1,5 ml de billes de verre lavées à l'acide (diamètre 425-600 μm). L'échantillon a alors été soumis pendant 15 min à une alternance de périodes de 30 s pendant lesquelles il était agité vigoureusement et de périodes de 30 s pendant lesquelles il était refroidi dans la glace.

Après une centrifugation à 2000 g pendant 3 min pour enlever les cellules intactes et les débris cellulaires, le surnageant a été centrifugé pendant 60 min à 18000 g. Le culot, contenant les protéines membranaires, a été resuspendu dans du tampon de cassage. Après un dosage protéique, il a été conservé à -20°C .

Préparation d'un extrait brut - protocole pour des quantités plus importantes (4-5 l de culture)

Les levures ont été cultivées à 30°C dans du milieu YPG jusqu'à une D.O. d'environ à 7 à 650 nm et récoltées par centrifugation. Le culot a été lavé avec de l'eau à 4°C (ajoutée de façon à obtenir une D.O. de 10 à 650 nm), puis avec du tampon de cassage contenant 10 mM de 2-mercaptéthanol. Les cellules (~ 40 g pour 5 l de culture) ont été gardées à -20°C .

Pour un échantillon de 40 g de cellules, le cassage a été réalisé dans un volume final de ~ 200 ml de tampon A avec 90 ml de billes de verre, en utilisant l'appareil Vibrogen Cell Mill VI 4 (Johanna Otto GmbH) pendant 7 min à 2°C , en faisant alterner des périodes de 30 s pendant lesquelles l'échantillon était agité vigoureusement et des périodes de 30 s pendant lesquelles l'échantillon était laissé au repos afin qu'il se refroidisse.

Après une centrifugation à 2000 g pendant 3 min pour enlever les cellules intactes et les débris cellulaires, le surnageant a été centrifugé pendant 60 min à 100000 g. Le culot, contenant les protéines membranaires, a été resuspendu dans du tampon de cassage.

Lavage d'un extrait brut à 1 M NaCl - Préparation d'un extrait de protéines membranaires

L'extrait brut de protéines membranaires a été dilué dans du tampon de cassage contenant des anti-protéases et 1 M de NaCl, de façon que la concentration protéique finale soit de 5 mg /ml. Il a ensuite été centrifugé, soit pendant 60 min à 18000 g (dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml), soit pendant 120 min à 20000 g (dans des tubes de 30 ml), en fonction du volume de l'échantillon. Le culot a été resuspendu dans du tampon de cassage.

Solubilisation des protéines membranaires

Les essais de solubilisation ont été réalisés en faisant varier la concentration en protéines et en détergent (*n*-dodécyl- β -D-maltoside (DM), de chez Roche), la force ionique, la température, ainsi que le temps d'incubation.

Les conditions permettant une bonne solubilisation de Yor1p à partir d'un extrait brut de protéines membranaires sont les suivantes : dilution des protéines à une concentration de 1 mg /ml dans du tampon de cassage contenant des anti-protéases et 100 mM de NaCl, addition de DM à une concentration finale de 0,25 % (poids /volume), puis incubation du mélange pendant 60 min à 4°C, sous agitation. Après centrifugation (60 min à 18000 g), le surnageant est récupéré.

Dans le cas des extraits lavés, la solubilisation a été effectuée sans addition de NaCl, en diluant les protéines à 0,25 mg /ml et en utilisant du DM à 0,25 % (poids /volume).

Les essais de solubilisation de Yor1p par d'autres détergents ont été réalisés à partir d'un extrait des protéines membranaires lavé à 1 M NaCl. Les protéines ont alors été diluées à une concentration de 2 mg /ml dans du tampon de cassage contenant des anti-protéases. Puis de l'OG (*n*-octyl- β -D-glucopyranoside), du Triton X-100, du Tween 20, du DOC (désoxycholate), du CHAPS ou du DM a été ajouté à une concentration finale de 0,6 %, et le mélange a été incubé pendant 60 min à 4°C, sous agitation. Après centrifugation (60 min à 18000 g), le surnageant a été récupéré. La concentration de chaque détergent était supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC).

Purification de la protéine Yor1p étiquetée avec un peptide de poly-histidine

Purification à partir d'un extrait brut de protéines membranaires

12 ml de résine Co-Sepharose CL-6B (TALON de chez Clontech) ont été centrifugés pendant 1 min à 800 g. Le surnageant (6 ml) a été éliminé et la résine (6 ml) a été équilibrée dans du tampon B10 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume), 10 mM imidazole) contenant 100 mM de NaCl et 0,25 % de DM (poids /volume). La résine a alors été incubée sous agitation avec 90 ml de surnageant de solubilisation supplémenté avec de l'imidazole à une concentration de 10 mM. Après une nuit à 4°C, le mélange d'incubation a été versé dans 4 colonnes *Poly-Prep* de chez Bio-Rad. Après récupération du liquide passé directement à travers la colonne, celle-ci a été lavée avec 120 ml de tampon B20 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume), 20 mM imidazole) contenant 100 mM de NaCl et 0,1 % de DM (poids /volume). L'élution de la colonne a été réalisée avec 24 ml de tampon B100 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume), 100 mM imidazole) contenant 100 mM de NaCl, 0,1 % de DM (poids /volume) et des anti-protéases.

L'éluat a été concentré 20 fois par centrifugation (4500 g) sur une membrane *Amicon Ultra 4 mL 30000 MWCO*. Il a ensuite été dialysé contre du tampon de dialyse (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 % DM (poids /volume), 50 % glycérol (volume /volume)) et conservé à -20°C.

Purification à partir d'un extrait des protéines membranaires lavé à 1 M NaCl

Le même protocole a été utilisé lorsque la protéine solubilisée a été préparée à partir d'un extrait de protéines membranaires lavé à 1 M NaCl, mis à part le fait que, dans ce cas, le tampon d'équilibrage de la colonne contenait 500 mM de NaCl et que la concentration de NaCl dans l'échantillon avait été ajustée à 500 mM.

Essais d'élution en présence d'autres détergents

Pour les essais d'élution en présence d'autres détergents que le DM, 3 ml de résine TALON ont été équilibrés dans du tampon B10 contenant 500 mM de NaCl et 0,25 % de DM (poids /volume). Cette résine a été incubée sous agitation avec 45 ml d'un surnageant de solubilisation obtenu à partir d'un extrait de protéines membranaires lavé à 1 M NaCl et supplémenté avec 10 mM d'imidazole et 500 mM de NaCl. Après une nuit à 4°C, le mélange d'incubation a été versé dans 12 colonnes *Micro Bio-Spin*. Après la récupération du liquide passé à travers les colonnes, chacune d'entre elles a été lavée avec 5 ml de tampon B20 contenant 100 mM de NaCl et du DM à 0,01 %, 0,1 % ou 1 % (poids /volume), du lysophosphatidylglycérol (LPG) à 0,1 % (poids /volume), du *n*-octyl-β-D-glucopyranoside (OG) à 0,5 % (poids /volume), du Triton X-100 à 0,5 % (volume /volume), du Tween 20 à 0,5 % (volume /volume), du désoxycholate (DOC) à 0,5 % (poids /volume), de la *n*-lauroyl-sarcosine (LS) à 0,5 % (poids /volume), du SDS à 0,5 % (poids /volume) ou du CHAPS à 1 % (poids /volume). L'élution de la colonne a été réalisée avec 1 ml de tampon B100 contenant 100 mM NaCl, des anti-protéases et le détergent étudié à la même concentration que dans le tampon de lavage.

Purification à partir d'un extrait des protéines membranaires solubilisé par d'autres détergents

500 µl de résine TALON ont été équilibrés dans du tampon B10 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume), 10 mM imidazole) contenant 500 mM de NaCl et 0,6 % du détergent étudié (OG, Triton X-100, Tween 20, DOC, CHAPS ou DM). Puis, cette résine a été incubée sous agitation avec 1 ml d'un surnageant de solubilisation obtenu avec ce même détergent et supplémenté avec 10 mM d'imidazole et 500 mM de NaCl. Après une nuit à 4°C, le mélange d'incubation a été versé dans une colonne *Micro Bio-Spin*. Après la récupération du liquide passé à travers la colonne, celle-ci a été lavée avec 2,5 ml de tampon B20 contenant

100 mM de NaCl et 0,6 % de détergent, puis éluée avec 1,5 ml de tampon B250 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume), 250 mM imidazole) contenant 100 mM de NaCl, des anti-protéases et 0,6 % de détergent. L'éluat a été concentré 6 fois par centrifugation (4500 g) sur une membrane *Amicon Ultra 4 mL 30000 MWCO*.

Purification à partir d'un extrait des protéines membranaires en présence de lipides

500 µl de résine TALON ont été équilibrés dans du tampon B10 contenant 500 mM de NaCl, 0,3 % de DM (poids /volume) et des lipides polaires d'*Escherichia coli* à une concentration de 1 ou 4 mg /ml. La résine a alors été incubée sous agitation avec 2 ml d'un surnageant de solubilisation obtenu avec 0,3 % de DM (poids /volume), à une concentration en protéines de 1 mg /ml et supplémenté avec 10 mM d'imidazole, 500 mM de NaCl et 1 ou 4 mg /ml de ces lipides. Après une nuit à 4°C, le mélange d'incubation a été versé dans une colonne *Micro Bio-Spin*. Après la récupération du liquide passé à travers la colonne, celle-ci a été lavée avec 2,5 ml de tampon B20 contenant 100 mM de NaCl, 0,3 % de DM (poids /volume) et des lipides polaires d'*Escherichia coli* à 1 ou 4 mg /ml. L'élution de la colonne a été réalisée avec 1,5 ml de tampon B250 contenant 100 mM de NaCl, 0,3 % de DM (poids /volume), des anti-protéases et des lipides polaires d'*Escherichia coli* à 1 ou 4 mg /ml. L'éluat a été concentré 6 fois par centrifugation (4500 g) sur une membrane *Amicon Ultra 4 mL 30000 MWCO*.

Essais de purification sur une colonne échangeuse d'ions (DEAE Sephacel)

Une colonne DEAE Sephacel (0,2 × 18,5 cm) a été préparée et équilibrée dans tampon B0 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume)) contenant 0,1 % de DM (poids /volume). L'éluat de la colonne de Co²⁺ a été dialysé contre le même tampon, puis appliqué sur la colonne de DEAE Sephacel à un débit de 0,2 ml /min. La colonne a été éluée successivement (à 0,2 ml /min) par des aliquots de 2 ml de tampon B0 contenant 0,1 % de DM (poids /volume) et du NaCl à des concentrations finales de 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 700 mM et 1,2 M. Des fractions de 2 ml ont été collectées et analysées.

Essais de purification sur une colonne greffée avec du nickel (Ni-NTA Agarose)

3 ml de résine Ni-NTA Agarose ont été équilibrés dans du tampon B10 contenant 100 mM de NaCl et 0,1 % de DM (poids /volume). L'éluat de la colonne de Co²⁺ (24 ml de tampon B100 contenant 100 mM de NaCl, 0,1 % de DM (poids /volume) et des anti-protéases) a été concentré par centrifugation (4500 g) sur une membrane *Amicon Ultra 4 mL 30000 MWCO* et ensuite dilué 10 fois dans du tampon B0 contenant 100 mM de NaCl, 0,1 % de DM (poids /volume) et des anti-protéases. L'échantillon de protéines a alors été incubé avec la

résine de Ni-NTA Agarose. Après une nuit à 4°C, le mélange d'incubation a été versé dans 2 colonnes *Poly-Prep*. Après récupération du liquide passé directement à travers la colonne, celle-ci a été lavée avec 30 ml de tampon B30 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 % glycérol (volume /volume), 30 mM imidazole) contenant 100 mM de NaCl et 0,1 % de DM (poids /volume). L'élution de la colonne a été réalisée avec 12 ml de tampon B250 contenant 100 mM de NaCl, 0,1 % de DM (poids /volume) et des anti-protéases. L'éluat a été concentré 10 fois par centrifugation (4500 g) sur une membrane *Amicon Ultra 4 mL 30000 MWCO*.

Extraction des protéines cytoplasmiques

Les plasmides pET15b1a ayant inséré les fragments d'ADN codant les domaines NBD1 et NBD2 ont été utilisés pour transformer la souche d'*Escherichia coli* Rosetta(DE3) pLacI. Après l'électroporation et l'ajout de 1 ml de milieu 2xTY, les bactéries ont été diluées 1000 fois dans du milieu 2xTY contenant 50 mg /l d'ampicilline et 34 mg /l de chloramphénicol, puis cultivées une nuit, sous agitation, à 37°C. La production du domaine NBD a alors été induite par l'addition d'IPTG à une concentration finale de 1 mM, suivie par une incubation de 3 h à température ambiante. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation et lavées avec du tampon de cassage B (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 % glycérol (volume /volume)). Le culot a ensuite été resuspendu dans du tampon de cassage B contenant 500 mM de NaCl et des anti-protéases, à raison de 1 volume de tampon pour 30 volumes de culture initiale. Les cellules bactériennes ont été lysées par un traitement ultrasonique à 4°C pendant 1 min (50 % du temps actif) pour les petits volumes de cellules (1 ml), ou pendant 6 min (50 % du temps actif) pour les volumes plus importants (35 ml). Après centrifugation (30 min à 18000 g), le surnageant contenant les protéines solubles a été récupéré. Le culot, contenant les protéines insolubles, a été resuspendu dans du tampon de cassage et centrifugé à 2000 g pendant 3 min pour éliminer les cellules intactes et les débris cellulaires.

Purification des domaines NBD de la protéine Yor1p (domaines étiquetés avec un peptide de poly-histidine)

Les domaines NBD de la protéine Yor1p ont été purifiés à partir de 2 l de culture pour NBD1 et de 0,5 l de culture pour NBD2. L'extrait brut contenant les protéines cytoplasmiques a été supplémenté avec de l'imidazole à une concentration de 10 mM, puis mis en contact avec 6 ml

de résine TALON équilibrée dans du tampon C10 (tampon de cassage B contenant 500 mM de NaCl et 10 mM d'imidazole). Après une nuit à 4°C, le mélange d'incubation a été versé dans un support de façon à former une colonne. Après la récupération du liquide passé à travers cette colonne, on a successivement appliqué sur celle-ci (à 1,5 ml /min) (i) 100 ml de tampon C10, (ii) 100 ml de tampon C25 (tampon de cassage B contenant 500 mM NaCl et 25 mM d'imidazole); dans le cas de NBD2 cette étape a été omise, (iii) 60 ml de tampon C100 (tampon de cassage B contenant 500 mM NaCl et 100 mM d'imidazole). Ces derniers 60 ml ont été collectés et concentrés 20 fois par centrifugation (4500 g) sur une membrane *Vivaspin 20 mL 10000 MWCO*.

La suite de la purification a été effectuée par chromatographie sur un système FPLC (Amersham Biosciences). L'éluat de la colonne de Co^{2+} a été appliqué sur un tamis moléculaire (Superdex 75, 1,6 × 60 cm, Amersham Biosciences) équilibré dans du tampon de cassage B contenant 500 mM de NaCl et 10 mM de 2-mercaptéthanol. La colonne a été éluée avec ce même tampon, à un débit de 0,4 ml /min. Des fractions de 2,5 ml ont été collectées. Les fractions contenant le domaine NBD purifié ont été réunies et concentrées jusqu'à un volume final de 3 ml par centrifugation (4500 g) sur une membrane *Amicon Ultra 4 mL 10000 MWCO*. La solution obtenue a été dialysée contre du tampon de dialyse (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 % glycérol (volume /volume)) et conservée à -20°C.

Reconstitution de la protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée dans des protéoliposomes

Pour reconstituer la protéine Yor1p-(His)₁₀ dans des protéoliposomes, nous avons utilisé la méthode développée par Rigaud *et al.* (1997).

La protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée a été diluée à 0,04 mg /ml dans du tampon SP (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10% glycérol (volume /volume), 1 mg /ml BSA et 1 mM DTT) contenant 2 mg /ml de lipides. Après 20 min d'incubation à 14°C, le détergent a été enlevé par une incubation de 3 h à 4°C en présence de 300 mg /ml de Bio-Beads (Bio-Rad) préalablement lavées au méthanol et à l'eau. Après la séparation des Bio-Beads, les protéoliposomes ont été dilués dans du tampon SP contenant 2 mg /ml de lipides, pour obtenir la concentration protéique désirée. Ils ont été utilisés immédiatement pour les dosages d'activité ATPasique. Les protéoliposomes ont été également analysés par microscopie électronique en coloration négative au Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale CNRS 2472 - INRA 1157,

avec la collaboration de Jean LEPAULT. Les résultats n'ont pas permis de conclure si la protéine était intégrée aux liposomes ou accrochée à ceux-ci.

La protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée en présence des lipides a été mise directement en contact avec 400 mg /ml de Bio-Beads préalablement lavées au méthanol et à l'eau. Après 1 h d'incubation à température ambiante, les Bio-Beads ont été retirées et l'échantillon a été utilisé immédiatement pour les dosages d'activité ATPasique.

Dosage de l'activité ATPasique

Tous les dosages d'activité ATPasique ont été réalisés dans un volume final de 100 µl, à 37°C, dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 contenant 2 mM de MgCl₂ et 10 µM de [γ -³²P]ATP (100-200 Ci /mol). La réaction a été arrêtée par l'addition de 1 ml d'une suspension de charbon activé à 1,2 % (poids /volume) dans du tampon 50 mM acétate de sodium, pH 4,5 contenant 0,35 % (poids /volume) d'acide perchlorique. Après 5 min d'incubation à 4°C, le charbon a été enlevé par deux centrifugations successives de 3 min à 18000 g. 750 µl de surnageant contenant le [³²P]-P_i libéré ont été mélangés à 5 ml de liquide de scintillation Pico-Fluor 15 (Perkin Elmer). La radioactivité présente dans l'échantillon a été quantifiée en utilisant un compteur à scintillation *LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter* (Beckman). L'activité ATPasique des extraits de membranes plasmiques a été mesurée pendant 15 min dans un mélange réactionnel contenant, en plus des composés indiqués ci-dessus, 0,2 mM de (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 50 mM de KNO₃, 5 mM de NaN₃, 10 µM d'EDTA, 0,2 mM de DTT, 2 % de glycérol (volume /volume) et 3 µg de protéines membranaires.

L'activité ATPasique de 0,1-0,2 µg de la protéine Yor1p-(His)₁₀ purifiée a été mesurée pendant 30-60 min en présence de 0,2 mM de DTT, 2 % de glycérol (volume /volume), 0,2 mg /ml de BSA et de 0,005 % de DM (poids /volume) pour la protéine solubilisée, ou de 0,4 mg /ml de lipides pour la protéine reconstituée dans des protéoliposomes.

L'activité ATPasique des domaines NBD de la protéine Yor1p a été mesurée pendant 10 min en présence de 0,2 mM de DTT, 2 % de glycérol (volume /volume) et 0,2 mg /ml de BSA.

Pour déterminer les constantes catalytiques de la réaction, l'activité ATPasique a été suivie en présence de concentrations d'ATP comprises entre 10 µM et 2 mM. La quantité de radioactivité dans chaque échantillon était constante (200 nCi). Les valeurs de V_{max} et de K_m ont été obtenues par une régression non-linéaire en utilisant le logiciel MC•Fit (Dardel, 1994).

Parfois, d'autres composés (substrats potentiels de Yor1p, inhibiteurs d'ATPases, etc.) ont été ajoutés dans le mélange réactionnel aux concentrations indiquées sur les figures ou dans les tableaux. L'oligomycine, les rhodamines 6G et 101, le *N,N'*-di-cyclohexyl-carbodiimide (DCC) et l'ouabaine ont été dissous dans de l'éthanol. Lorsque ces produits ont été ajoutés au mélange réactionnel, la concentration finale d'éthanol a été de 2 % (volume /volume). La solution stock de vanadate a été préparée comme décrit précédemment (Goodno, 1982). Elle a été incubée pendant 2 min à 95°C avant chaque utilisation.

Marquage par le 8-azido-[α -³²P]ATP

Le marquage par le 8-azido-[α -³²P]ATP a été réalisé sur 10 µg de protéines membranaires ou sur 20 pmol de NBD1 ou de NBD2, dans un volume final de 20 µl, à 4°C, dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 contenant 2 mM MgCl₂, 10 % glycérol (volume /volume) et 5 µM 8-azido-[α -³²P]ATP (20 Ci /mmol). Après une incubation à 4°C pendant 20 min, le mélange a été soumis pendant 10 s à un rayonnement UV de longueur d'onde 312 nm (puissance de la lampe : 6 × 15 W), puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie pour évaluer la quantité de protéines déposée dans chaque puits, séchés et autoradiographiés. Une analyse densitométrique des images des gels colorés au bleu de Coomassie, ainsi que de l'autoradiographie a été réalisée en utilisant le logiciel *BIO-PROFIL Bio-1D v.10.02* (Vilber Lourmat).

Dans l'expérience de déplacement par l'ATP du 8-azido-[α -³²P]ATP fixé sur Yor1p, l'ATP a été ajouté à des concentrations finales de 0 à 10 mM, après 10 min d'incubation avec le 8-azido-[α -³²P]ATP. L'incubation a été poursuivie pendant 10 min.

Dans certains échantillons, indiqués dans les légendes des figures, le MgCl₂ a été omis. L'ATP ou l'oligomycine ont été ajoutés dans le mélange de marquage aux concentrations indiquées.

Interaction des domaines NBD de la protéine Yor1p avec le TNP-ATP

Le TNP-ATP (2'-(ou-3')-O-(2, 4, 6-trinitrophényl)-adénosine 5'-triphosphate) a été acheté chez Molecular Probes sous forme d'une solution à 5 mg /ml (6,38 mM).

Pour les expériences de fluorescence avec ce nucléotide, les domaines NBD de la protéine Yor1p ont été dilués à une concentration de 6 μM dans 800 μl de tampon Fluo (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM DTT, 20 % glycérol (volume /volume)).

Fixation du TNP-ATP sur les domaines NBD de Yor1p

Pour déterminer la constante de fixation du TNP-ATP sur les domaines NBD, le TNP-ATP a été dilué à une concentration de 400 μM dans le tampon Fluo. Des aliquots de cette solution ont été ajoutés soit à 800 μl de domaine NBD (6 μM), soit à 800 μl de tampon Fluo. Après 2 min d'incubation à 4°C, la D.O. à 408 nm a été enregistrée, ainsi que la fluorescence à 535 nm (après une excitation à 408 nm).

La mesure de la D.O. à 408 nm, réalisée avec un spectrophotomètre UV2101PC (Shimadzu), nous a permis de calculer précisément la concentration de TNP-ATP dans l'échantillon ($\epsilon_{\text{TNP-ATP}} = 26400 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ l}$, $L = 1 \text{ cm}$).

La fluorescence du TNP-ATP a été mesurée en utilisant le spectrofluorimètre Jobin-Yvon déjà décrit ci-dessus.

Jusqu'à une concentration de 15 μM , la fluorescence du TNP-ATP en absence de protéine a augmenté proportionnellement avec sa concentration : $\text{Fluo} = a \times [\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}]$. Au delà de cette concentration, à cause de l'effet de filtre interne, un écart a été constaté entre la fluorescence expérimentale F et la valeur calculée par la formule $a \times [\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}]$. Le rapport $f = a \times [\text{TNP-ATP}] / F$ a permis d'évaluer l'atténuation du signal due à l'effet de filtre interne. Ce facteur a été utilisé pour corriger la fluorescence observée en présence de protéine à des concentrations de TNP-ATP supérieures à 15 μM .

Les courbes enregistrées en présence de protéine et corrigées pour l'effet de filtre interne ont été analysées selon l'équation suivante afin de déterminer la constante de dissociation K du complexe formé entre le TNP-ATP et le NBD.

$$\text{Fluo} = a \times [\text{TNP-ATP}] + A \times [\text{NBD:TNP-ATP}]$$

où :

$$[\text{TNP-ATP}] = \frac{[\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}] - K - [\text{NBD}_{\text{tot}}] + \sqrt{(K + [\text{NBD}_{\text{tot}}] - [\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}])^2 + 4[\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}]K}}{2}$$

$$[\text{NBD:TNP-ATP}] = \frac{[\text{NBD}_{\text{tot}}]}{1 + \frac{K}{[\text{TNP-ATP}]}}$$

Déplacement par des nucléotides du TNP-ATP fixé sur les domaines NBD de Yor1p

800 µl de domaine NBD (6 µM) dans du tampon Fluo ont été mélangés avec 1,5 µl de TNP-ATP à 6,38 mM. Après 5 min d'incubation à 4°C, nous avons enregistré la D.O. à 408 nm pour déterminer la concentration exacte du TNP-ATP et la fluorescence à 535 nm (après une excitation à 408 nm). Des aliquots de 2 µl de solutions d'ATP, de GTP, de CTP ou d'UTP ont ensuite été ajoutés à ce mélange. Après chaque ajout de nucléotide, l'échantillon a été incubé pendant 4 min à 4°C, avant que sa fluorescence à 535 nm ne soit enregistrée (après une excitation à 408 nm).

Les courbes obtenues ont été analysées en supposant que le nucléotide ajouté inhibe de façon compétitive la fixation de TNP-ATP sur le domaine. Cela a permis de déterminer le K_d du NTP pour le NBD en utilisant l'équation :

$$\text{Fluo} = a \times [\text{TNP-ATP}] + A \times [\text{NBD:TNP-ATP}]$$

où :

$$[\text{NBD:TNP-ATP}] = \frac{[\text{NBD}_{\text{tot}}] + [\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}] + K \left(1 + \frac{[\text{NTP}]}{K_d} \right) - \sqrt{\left([\text{NBD}_{\text{tot}}] + [\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}] + K \left(1 + \frac{[\text{NTP}]}{K_d} \right) \right)^2 - 4[\text{NBD}_{\text{tot}}][\text{TNP-ATP}]}}{2}$$

$$[\text{TNP-ATP}] = [\text{TNP-ATP}_{\text{tot}}] - [\text{NBD:TNP-ATP}]$$

Réduction du MTS

La réduction du MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) a été suivie à 490 nm, pendant 15 h, avec un spectrophotomètre Uvikon 922 (Kontron Instruments). Le MTS a été dilué à une concentration finale de 190 µM dans de milieu MMYG-Ura-His-Leu supplémenté, dans certain cas, avec du glutathion (200 µM), du sélénite (10 µM) et /ou de la superoxyde dismutase (250 U /ml).

Annexes

Annexe 1. Alignement des séquences des domaines NBD dont la structure a été obtenue à haute résolution (pour plus de détails sur ces protéines, voir le Tableau 1). Les motifs conservés des NBD sont en rouge (Walker-A), orange (boucle Q), magenta (motif signature), bleu foncé (Walker-B), gris (boucle H) et vert (résidu aromatique). Cet alignement a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

HisP	1	-----MMSENKLHVIDLHKRYG-----GHEVLKGVSLQ---ARAG
T.l.Malk	1	-----MAGVRLVDVWVKVFG-----EVTAVREMSLE---VKDG
E.c.Malk	1	-----MASVQLQNVTKAWG-----EVVVS KDINLD---IHEG
MJ1267	1	-----MRDTMEILRTENIVKYFG-----EFKALDGVVSIS---VNKG
MJ0796	1	-----MIKLKNVTKTYKMGE-----EIIYALKNVNLN---IKEG
TAP1	489	PPSGLLTPLHLEGLVQFQDVSAFYNR-----PDVLVLQGLTFT---LRPG
HlyB	1	-----DITFRNIRFRYKP-----DSPVILDNINLS---IKQG
GlcV	1	-----MVRIVKNVSKVFK--K-----GKVVALDNVNIN---IENG
PH0022	1	-----MGNNIEVIMVEVKLENLTKR-----GNFTAVNKLNLMT---IKDG
CysA	1	-----MTIEFVGVEKIYP-----GGARSVRGVSFQ---IREG
TM1139	1	-----MSDIVLEVQSLHVVYVG-----AIHAIKGIDLK---VPRG
LmrA	349	-----LSARHVDFAIDD-----SEQ-ILRDISFE---AQPN
PF0895	1	-----MKLEIRDLSVGYD-----KPVLERITMT---IEKG
TM0544	1	-----MGAVVVKDLRKRIG-----KKEILKGISFE---IEEG
mCFTR-NBD1	388	-----STTGIIMENVTAFWEEGFGELLEKVQQSNGDRKHSSDENNVSFSLHCLVGNPVLKNINLN---IEKG
hCFTR-NBD1	388	-----TTTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRKTSSNGDDSLFFSNFSLGLTPVLKDINFK---IERG
E.c.MsbA-NBD	342	-----VEFRNVFTFTYPG-----RDVPALRNINLK---IPAG
V.c.MsbA-NBD	342	-----VDVKDVTFTYQG-----KEKPALSHVSFS---IPQG
S.t.MsbA-NBD	342	-----LEFRNVFTFTYPG-----REVPA LRNINLK---IPAG
BtuD	1	-----MSIVMLQDVAESTR-----LGPLSGE---VRAG
RLI-NBD1	73	-----EQLEEDCVHRYG-----VNAFVLYRLPV---VKEG
RLI-NBD2	331	-----RVEIERETLVTYPR-----VKDYGSRLEVEPGEIKKG
SuFC	1	-----MSQLEIRDLWA-----SIDGETILKGVN-LVVPKG
Rad50cd	1	-----MKLERVTVKNFR-----SHSDTVVEFK-----E
T.m.-SMChd	1	-----MRLKKLYLKGF-----KSFG-RPSLIGF---SD
S.c.-SMChd	1	-----MGRVLGLELSNF-----KSYRGVTKVGF---ES
P.f.-SMCcd	1	-----MPYIEKLELKG-----KSYGNKKVVIPIF---SK
T.a.MutS-NBD	543	-----VRPRFGDR--LQIRAGRHPVV-----ERRT--EFVPNDLEMA--H
E.c.MutS-NBD	568	-----TCPTFIDKPGIRITGRHPVV-----EQVLNEPFIANPLNLSPQR

résidu aromatique

HisP	DVISIIGSSGSGKSTFLRCINFLEKP-----SEGAIIVNG--
T.l.Malk	EFMILLGPSGCGKTTTLRMIAGLEEP-----SRGQIYIGD--
E.c.Malk	EFVVFVGPSGCGKSTLLRMIAGLETI-----TSGLDFIGE--
MJ1267	DVTLII GPNGSGKSTLINVITGFLKA-----DEGRVYFEN--
MJ0796	EFVSI MGPSGSGKSTMLNIIGCLDKP-----TEGEVYIDN--
TAP1	EVTALV GPNGSGKSTVAALLQNLVYQ-----TGGQLLLDG--
HlyB	EVIGIVGRSGSGKSTLTKLQRFYIP-----ENGQVLIDG--
GlcV	ERFGILGPSGAGKTTFMRIIAGLDVP-----STGELYFDD--
PH0022	EFLVLLGPSGCGKTTTLRMIAGLEEP-----TEGRIYFGD--
CysA	EMVGLLGPSGSGKTTILRLIAGLERP-----TKGDVWIGG--
TM1139	QIVTLI GAGGAGKTTLSAIAGLVRA-----QKGIIFNG--
LmrA	SIIFAGGPSGGGKSTIFSLLERFYQP-----TAGEITIDG--
PF0895	NVVNFH GPNGIGKTTLLKTISTYLP-----LKGEIINYNG--
TM0544	EIFGLI GPNGAGKTTTLRIISTLIK-----SSGIVTVFG--
mCFTR-NBD1	EMLAITGSTGSGKSTLLMLILGELEA-----SEGIKHSK--
hCFTR-NBD1	QLLAVAGSTGAGKSTLLMMIMGELEP-----SEGKIKHSK--
E.c.MsbA-NBD	KTVALVGRSGSGKSTIASLITRFYDI-----DEGEILMDG--
V.c.MsbA-NBD	KTVALVGRSGSGKSTIANLFRFYDV-----DSGSICLDG--
S.t.MsbA-NBD	KTVALVGRSGSGKSTIASLITRFYDI-----DEGHILMDG--
BtuD	EILHLV GPNGAGKSTLLARMAGMTSG-----KGSIQFAG--
RLI-NBD1	MVVGIV GPNGTGKSTAVKILAGLTPNL-----CGDNDSWDG--
RLI-NBD2	EVIGIV GPNGIGKTTFVKMLAGVEEP-----TEGKIEWD--
SuFC	EVHALM GPNGAGKSTLGKILAGDPEYTV-----ERGEILLDG--
Rad50cd	GINLII GQNGSGKSSLLDAILVLGYW--PLRIKDIKKDEFTKVG-----ARDTYIDLIFEK--
T.m.-SMChd	RVTALV GPNGSGKSNIIIDAIKWVFGESKSELRASEKFDIMIFAGSEN-----PPAGSAYVELVFE--
S.c.-SMChd	NFTSII GPNGSGKSNMMDAISVWFGVRSN--HLRSNLIKDLIYRGVLNDENSDDYDNEGAASSNPQSAFYQK--
P.f.-SMCcd	GFTAIV GAGSGKSNIGDAILFVLGGLSAKAMRASRISDLIFAGSKNE-----PPAKYAEVAIYFNNED
T.a.MutS-NBD	ELVLIT GPNMAGKSTFLRQTALIALLAQVGSFV-----PAEEAHLPLF-
E.c.MutS-NBD	RMLIIT GPNMGGKSTYMRQTALIALMAYIGSYV-----PAQKVEIGPI-

walker A


```

HisP          -----QNINLVRD-----KDGQLKVADKNQLRLLRTRLTMVFQHFNLSH
T.l.MaIk      -----KLVDPEKG-----IFVPPKDRDIAMVFQSYALYPH
E.c.MaIk      -----KRMN-----DTPPAERGVMVFQSYALYPH
MJ1267        -----KDITN-----KEPAELYHYGIVRTFQTPQLKE
MJ0796        -----IKTNDLDD-----ELTKIRRDKIGFVFQQFNLIPL
TAP1          -----KPLP-----QYEHRYLHRQVAAGQEPQVFGR
HlyB          -----HDLA-----LADPNWLRQVGVVLQDNVLLNR
GlcV          -----RLVASNGK-----LIVPPEDRKIGMVFQTWALYPN
PH0022        -----RDVT-----YLPKDRNISMVFQSYAVWPH
CysA          -----KRVV-----DLPPQKRNVLGVFQNYALFQH
TM1139        -----QDITN-----KPAHVINRMGIALVPEGRRIFPE
LmrA          -----QPID-----NISLENWRSQIGFVSQDSAIMAG
PF0895        -----VPIT-----KVGKIFFLPEEIIIVP
TM0544        -----KNVV-----EEPHEVRKLISYLPEEAGAYRN
mCFTR-NBD1    -----RVSFCSQFSWIMPG
hCFTR-NBD1    -----RISFCSQFSWIMPG
E.c.MsbA-NBD  -----HDLR-----EYTLASLRNQVALVSQNVHLFND
V.c.MsbA-NBD  -----HDVR-----DYKLTNLRRHFALVSQNVHLFND
S.t.MsbA-NBD  -----HDLR-----EYTLASLRNQVALVSQNVHLFND
BtuD          -----QPLEA-----WSATKLALHRAVLSQQQTPPPFA
RLI-NBD1      -----VIRAFRGNE-----LQNYFEKLKNGEIRPVVKPQYVDLIPK
RLI-NBD2      -----LTWAYKPKYIKADYE
SufC          -----ENILELS-----PDERARKGLFLAFQYPPVEVPG
Rad50cd       -----DGTKYRITRRFLKGYSSGEIHAMKRLVGNEWKHVTEPSSKAISAFMEKLIPYNIFLNAI--YIRGGQIDAIL
T.m.-SMChd    -----NGEEITVARELKRTGE--NTYYLN----GSPVRLKDIRDRFA-----GTGLGVDFYS--IVGGQIDIRIV
S.c.-SMChd    -----GNKLVELMRIISRNGD--TSYKID----GKTVSYKDYSIFLE-----NENILIKAKNF-LVFQGDVEQIA
P.f.-SMCcd    RGFPIDEDEVVIRRRVYPDGR--SSYWLN----GRRATRSEILDILT-----AAMISPDGYN_IVLQGDITKFI
T.a.MutS-NBD  -----DGIYTRIGASDD
E.c.MutS-NBD  -----DRIFTRVGAADD
                                     boucle Q

```

```

HisP          MTVLENVMEAPIQVLG-----
T.l.MaIk      MTVDYN-IAFPLKLRK-----
E.c.MaIk      LSVAEN-MSFGLKLAG-----
MJ1267        MTVLENLLIGEINPGESPLNSLFY-----
MJ0796        LTALEN-VELPLIFKYRG-----
TAP1          SLQENIAYGLTQKPTMEE-----
HlyB          SIIDNISLANPG-MSVEK-----
GlcV          LTAFEN-IAFPLTNMK-----
PH0022        MTVDYN-IAFPLKIKK-----
CysA          MTVDYN-VSFGLEKR-----
TM1139        LTVYEN-LMMGAYNRKD-----
LmrA          TIRENLTYGLEGDYDDED-----
PF0895        RKISVEDYLKAVASLYG-----
TM0544        MQGIEY-LRFVAGFYAS-----
mCFTR-NBD1    TIKENIIFGVSYDEYR-----
hCFTR-NBD1    TIKENIIFGVSYDEYR-----
E.c.MsbA-NBD  TVANNIAYARTEQYSREQ-----
V.c.MsbA-NBD  TIANNIAYAAEGEYTREQ-----
S.t.MsbA-NBD  TVANNIAYARTEEYSREQ-----
BtuD          TPVWHYLT LHQ-----
RLI-NBD1      AVKGKVIEL LKKAD-----
RLI-NBD2      G---TVYELLSKID-----
SufC          VTIANFLRLALQAKLG-----
Rad50cd       ESDEAR-----153 linker 738 --
T.m.-SMChd    NASPEELRL-----152 linker 1023 --
S.c.-SMChd    AQSPVELSRMFEEVSGSIQYKKEYEELKEKIEKLSKATESIKNRRRIHGELKTYK214 linker 1024 RY
P.f.-SMCcd    KMSPLERRLLIDDISGIAEYDSKKEKALEE-----182 linker 1006 --
T.a.MutS-NBD  -----
E.c.MutS-NBD  -----

```

```

HisP -----LSKHD-ARER
T.l.MaIk -----VPRQE-IDQR
E.c.MaIk -----AKKEV-INQR
MJ1267 -----KKWIPKEEEMVEK
MJ0796 -----AMSGEE-RRKR
TAP1 -----ITAAAVKSGA
HlyB -----VIYAAKLAGA
GlcV -----MSKEE-IRKR
PH0022 -----FPKDE-IDKR
CysA -----VPKDE-MDAR
TM1139 -----KEGIKRD---LEW
LmrA -----LWQVLDLAFA
PF0895 -----VKVNM---NE
TM0544 -----SSSEIEEM
mCFTR-NBD1 -----YKSVVKACQL
hCFTR-NBD1 -----YRSVIKACQL
E.c.MsBA-NBD -----IEEAARMAYA
V.c.MsBA-NBD -----IEQAARQAHA
S.t.MsBA-NBD -----IEEAARMAYA
BtuD -----HDKTRTEL
RLI-NBD1 -----ETGKL-----
RLI-NBD2 -----AS-KLNSNFY
SufC -----REVGVAEFWTKV
Rad50cd -----ALAREAAALSKIGELASEIFAETEG-----KYSEVVVRA
T.m.-SMChd -----YQRVNESFNRFISLLF-----FGGEGRLNIV
S.c.-SMChd DEAEGRFEVINNETEQLKAEKKILNQFLIKKKRKELFEKTFDYVSDHLDAIYRELTKNPNSNVELAGGNASLTIE
P.f.-SMCcd -----EKEKKNVFMRTFEAISRNFS EIFAKLS-----PGGSARL-IL
T.a.MutS-NBD -----
E.c.MutS-NBD -----

```

```

HisP ALKYLAKVGIDER-----AQGKYPVHLSSGGQQQRVSIARALAME-----PDVLLFDEPTSLDPELVGEVLRIM
T.l.MaIk VREVAELLGLTE-----LLNRKPRELSSGGQQQRVALGRAIVRK-----PQVFLMDEPLSNLDAKLRVRMRAEL
E.c.MaIk VNQVAEVLQLAH-----LLDRKPKALSSGGQQQRVAIGRTLVAE-----PSVFLLEDEPLSNLDAALRVQMRIEI
MJ1267 AFKILEFLKLSH-----LYDRKAGELSSGGQMKLVEIGRALMTN-----PKMIVMDQPIAGVAPGLAHDIFNHV
MJ0796 ALECLKMAELEER-----FANHKNPQLSSGGQQQRVAIARALANN-----PPILADEPTGALDSKTGEKIMQLL
TAP1 HSFISGLPQGYDT-----EVDEAGSQLSSGGQQQRVALARALIRK-----PCVLILDDATSLDANSQLQVEQLL
HlyB HDFISELREGYNT-----IVGEQAGLSSGGQQQRVAIARALVNN-----PKILIFDEATSALDYSEHVIMRNM
GlcV VEEVAKILDIIH-----VLNHFPRELSSGGQQQRVALARALVKD-----PSLILLDEPFSNLDARMRDSARALV
PH0022 VRWAAELLQIEE-----LLNRYPAQLSSGGQQQRVAVARAIVVE-----PDVLLMDEPLSNLDAKLRVAMRAEI
CysA VRELLRFMRLES-----YANRFPHELSSGGQQQRVALARALAPR-----PQVLLFDEPFAAIDTQIRRELRTFV
TM1139 IFSL--FPRLKE-----RLKQLGGTSSGGEQQMLAIGRALMSR-----PKLLMDEPSLGLAPILVSEVFEVI
LmrA RSFVENMPDQLNT-----EVGERGVKLSGGQQQRVAIARAFRLN-----PKILMLDEATSLDSESESMVQKAL
PF0895 IMDALESVEVLD-----LKKKLGE LSQGTIRRVQLASTLLVN-----AEIYVLDDEPVAIDEDSKHKVLKSI
TM0544 VERATEIAGLGEK-----IKDRVSTYSKGMVRKLLIARALMVN-----PRLAILDEPTSGLDVNLNAREVRKIL
mCFTR-NBD1 QQDITKFAEQDNT-----VLGEGGVTSSGGQQRVSLARAVYKD-----ADLYLLDSPFGYLDVFTFEEQVFESC
hCFTR-NBD1 EEDISKFAEKDNI-----VLGEGGITSSGGQQRVSLARAVYKD-----ADLYLLDSPFGYLDVLTKEIFEESC
E.c.MsBA-NBD MDFINKMDNGLDT-----VIGENGVLSSGGQQQRVAIARALLRD-----SPILILDEATSALDTERAIQAAL
V.c.MsBA-NBD MEFIENMPQGLD-----VIGENGTSLSGGQQQRVAIARALLRD-----APVLILDEATSALDTERAIQAAL
S.t.MsBA-NBD MDFINKMDNGLD-----IIGENGVLSSGGQQQRVAIARALLRD-----SPILILDEATSALDTERAIQAAL
BtuD LNDVAGALALDD-----KLGRSTNQLSSGGEWQVRVLAAVVLQITPQANPAGQLLLLDPMNSLDVAQQSALDKIL
RLI-NBD1 -EEVVKALELEN-----VLDREIQHLSGGELQVVAIAAALLRN-----ATFYFFDEPSSYLDIRQLNAAARI
RLI-NBD2 KTELLKPLGIID-----LYDREVNELSSGGEQLQVVAIAATLLRD-----ADLYLLDEPSAYLDVEQRLAVSRAI
SufC KKALELLDWDESY-----LSRYLNEGSSGGEKKRNEILQLLVLE-----PTYAVLDETDGSLDIDALKVVARGV
Rad50cd EENKVRLFVWEG-----KERPLTFSSGGERIALGLAFRLAMSLYLAG-EISLLILDEPTPYLDEERRRKLITIM
T.m.-SMChd SEAKSILDAGFEISIRKPGRRDQKLSLSSGGEKALVGLALLFALMEIKP---SPFFVLDEVDSPLDYNAERFKRLI
S.c.-SMChd DE-DEPNAGIKYHATPPLKRFKDMEYLSGGEKTVAAALLLFAINSYQP---SPFFVLDEVDALDITNVQRIAAIYI
P.f.-SMCcd ENPEDPFGSGGLEIEAKPAGKDVKRIEAMSGGEKALTALAFVFAIQKFKP---APFYLFDEIDAHLDDANVKRVADLI
T.a.MutS-NBD -----LAGGKSTFMVEMEVALILKEAT--E---NSLVLLDEVGRGTSSLDGVAIATAV
E.c.MutS-NBD -----LASGRSTFMVEMTETANILHNAT--E---YSLVLMDEIGRGTSTYDGLSLAWAC
signature ABC walker B

```

boucle H

HisP	-----
T.l.MalK	VDFGEFRLKLLPDQ---FEVLGELGYVGREVI FGIRPEDL-YDAMFAQVRVPGENLVRAVVEIVENLGSERIVRLRV
E.c.MalK	IDQVQVELPMPNRRQQVWLVPVESRDVQVGANMSLGIRPEHLLPSDIADVI-----LEGEVQVVEQLGNETQIHIQI
MJ1267	-----
MJ0796	-----
TAP1	-----
HlyB	-----
GlcV	VIG-SLRFPVSVSS-----DRAIIGIRPEDVKLSKDVIKDD-SWILVGKGKVKVIGYQG--LFRITII
PH0022	LEGRGFRIELPQDL--MDLLKD--YVGKTVLFGIRPEHMTVEGVSELAHMKRTARLIGKVDVFVEALGTDITLHVKF
CysA	AGAALPVDPAVSEG-----SEVAVVVRPKDVELQPASEREHAQVVRSAFKGYSACWIRTKDGEVWE
TM1139	-----
LmrA	-----
PF0895	-----
TM0544	-----
mCFTR-NBD1	LRRFSVDD-----
hCFTR-NBD1	LHRFSLEGDAPVS-----
E.c.MsbA-NBD	-----
S.t.MsbA-NBD	-----
V.c.MsbA-NBD	-----
BtuD	-----
RLI-NBD1	KFTKTGE-----
RLI-NBD2	GSVKDREQKEKGEYYYIA-----
SufC	-----
Rad50cd	-----
T.m.-SMChd	-----
S.c.-SMChd	-----
P.f.-SMCcd	-----
T.a.MutS-NBD	ARALLQAMAAR-----
E.c.MutS-NBD	-----

HisP	-----	262
T.l.Ma1K	GGVTFVGSFRSE--SRVREGVEVDVVFDMKKIHIF--DKTTGKAIF-----	372
E.c.Ma1K	PSIRQNLVYRQNDVVLVEEGATFAIGLPPERCHLFREDGTACRRLHKEPGV	371
MJ1267	-----	257
MJ0796	-----	235
TAP1	-----	748
HlyB	-----	241
GlcV	TPLDSEEEIFTYSDHPIHSGEEVLVYVRKDKIKVFEKN-----	353
PH0022	GDELVKVKLPQH--IPIEPGREVKVIMDLDMIHVF--DKDTEKAIV-----	373
CysA	VHVPSADRRHWSPGAWVHMNVTRWFIFPR-----	343
TM1139	-----	239
LmrA	-----	590
PF0895	-----	206
TM0544	-----	244
mCFTR-NBD1	-----	674
hCFTR-NBD1	-----	678
E.c.MsbA-NBD	-----	582
S.t.MsbA-NBD	-----	582
V.c.MsbA-NBD	-----	582
BtuD	-----	249
RLI-NBD1	-----	330
RLI-NBD2	-----	590
SufC	-----	250
Rad50cd	-----	882
T.m.-SMChd	-----	1164
S.c.-SMChd	-----	1225
P.f.-SMCcd	-----	1177
T.a.MutS-NBD	-----	765
E.c.MutS-NBD	-----	765

Annexe 2. Alignement des séquences des domaines NBD1 de protéines ABC humaines et de levure appartenant à la sous-famille ABCC, de la P-glycoprotéine humaine, ainsi que de quelques NBD dont la structure a été résolue à haute résolution (HisP, MJ0796, TAP1 et mCFTR-NBD1). Les motifs conservés des NBD sont en rouge (Walker-A), orange (boucle Q), magenta (motif signature), bleu foncé (Walker-B), gris (boucle H) et vert (résidu aromatique). Les flèches verticales indiquent le début et la fin des différentes constructions génétiques que nous avons effectuées pour produire sous forme isolée le domaine NBD1 de Yor1p. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

HisP	1	-----MSENKLHVIDLHKRYGG-----
MJ0796	1	-----MIKLNVTKT ^Y KMGEEI-----
TAP1	489	-----PPSGLLTPLHLEGLVQFQDVSFAY ^Y PNRPD-----
mCFTR-NBD1	388	-----STGTIIMENVTA ^F WEEGFGELEK--VQQSNDRKHSSD-----
ABCB1-MDR1	373	-SIDSYSKSGHK-PDNIKGNLEFRNVHFS ^Y PSRKE-----
ABCC1-MRP1	625	-LEPDSIERRPVKDGGGTNSITVRNATFT ^W ARSDP-----
ABCC2-MRP2	622	-LDTSAIRHDCNFDK---AMQFSEASFT ^W EHDS-----
ABCC3-MRP3	611	-LDPQSVERKTISPG---YAITIHS ^G TFT ^W AQDLP-----
ABCC4-MRP4	395	---ISQRNRQLPSDG--KKMVHVQDFTAF ^W DKASET-----
ABCC5-MRP5	476	---VHMIKNKPASPH---IKIEMKNATL ^W DSSSHSIQNSPKLTPKMKKDKRASRGKKEKVRQLQRTEHQAVLAEQK
ABCC6-MRP6	610	-VDPGVVDSSSSGSAAGKDCITIHSATF ^W SQESP-----
ABCC7-CFTR	380	-----YKTLEYNLTTTEVVMENVTA ^F WEEGFGELEK--AKQNNNNRKTNSG-----
ABCC11-MRP8	460	---PVFYVQTLQDPS---KALVFEEATLS ^W QQTCPGIVNG---ALELERNGHASEG-----MTRPRDALG---
YCF1	607	LQPD ^S VQRLPKVKNI ^G DVAINIGDDATFL ^W QRK-----
BPT1	595	IDDSFIERIDPSADERALPAIEMNNITFL ^W KSKEVLTSSQ-----
YBT1	679	-----TKKYDQLTIDPNGNRFAFENSTIS ^W DKDNQD-----
VMR1	649	-----TEKYNQLTISPDKNKIEFKNATL ^W NENDSDM-----
NFT1	638	-----TRKYEILEQS---NTKFGFEDASME ^W EAAETS-----
YOR1	510	DDPNQMIEMKPSPGFDPKLALKMTHCSF ^W EDYELNDAIEEAKGEAKDEGKKNKKR ^K KDTWGKPSASTNKAKRLDN-
		↑ ↑ ↑ ↑ résidu aromatique

HisP	-----HEVLKGV ^S -LQARAGVISII ^{GSSGSGK} STFLRCINFLEKPSEGAIIVNG
MJ0796	-----IYALKNVN-LNIKEGEFVSIM ^{GPSGSGK} STMLNIIGCLDKPTEGEVYIDN
TAP1	-----VLVLQGLT-FTLRPGEVTALV ^{GPNGSGK} STVAALLQNL ^Y QPTGG---QLL
mCFTR-NBD1	-----ENNVSFSLCLVGNPVLKNIN-LNIEKGEMLAIT ^{GSTGSGK} TSLMLILGELEASEG-----
ABCB1-MDR1	-----VKILKGLN-LKVQSGQTVALV ^{GNSGCGK} STTVQLMQRLYDPTGEG---MVS
ABCC1-MRP1	-----PTLNGIT-FSIPEGALVAVV ^{GQVGCCK} SLLSALLAEMDKVEG-----
ABCC2-MRP2	-----ATVRDVN-LDIMAGQLVAVI ^{GPVGSCK} SLLSAMLGEMENVHG-----
ABCC3-MRP3	-----PTLHSLD-IQVPK ^{GALVAVV} GPVGCCKSLLVSALLGEMEKLEG-----
ABCC4-MRP4	-----PTLQGLS-FTVRPGELLAVV ^{GPVAGCK} SLLSAVLGELAPSHG-----
ABCC5-MRP5	GHL ^L LDSDERPSPEEEEGKHIHLGHLRLQRTLHSID-LEIQEGKLVGIC ^{GSVGSCK} STLSAILGQMTLLEG-----
ABCC6-MRP6	-----PCLHRIN-LTVPQGCLLAVV ^{GPVAGCK} SLLSALLGELSKVEG-----
ABCC7-CFTR	-----DDSLFFSNFSLGLTPVLKDIN-FKIERGQLLAVAG ^{STGAGK} TSLMMIMGELEPSEG-----
ABCC11-MRP8	-----PEEEGN-----SLGPELHKIN-LVVS ^{KGMMLGVC} GNTGSGKSLLSAILEEMHLEG-----
YCF1	-----PEYKVALKNIN-FQAKKGNLTCIV ^{GKVGSCK} TALLSCMLGDRFRVKG-----
BPT1	-----SGDNLRTDEESII ^{GSSQ} IALKNIDHFEAKRGDLVCVV ^{GRVAGCK} STFLKAILGQLPCMSGSRDSIP
YBT1	-----FKLKDLN-IEFKTGKLN ^{VVI} GPTGSGKTSLLMALLGEMYLNGKVVVPA
VMR1	-----NAFKLCGLN-IKFQIGKLN ^{LIL} GSTGSGKSALLGLLGELNLSGSIIVPS
NFT1	-----FKLK ^{NI} S-IDFKLNSLNAII ^{GPTGSGK} SLLGLLGELNLSGKIYVPT
YOR1	-----MLKDRDGPEDLEKTSFRGFKDLN-FDIKKGEFIMIT ^{GPIGTGK} SLLNAMAGSMRKTG-----
	Walker A

HisP QNINLVRDKDGLKQVADKNQLRLRLTRLTMVFQHFNLWSHMTVLENVMEAP-IQVLG--LSKHDARERALKYLAKVGI
 MJ0796 IKTNDLDDDE-----LTKIRRDKIGFVFQQFNLIPLLTALENVLPL-IFKYRGAMSGEERRKRALECLKMAEL
 TAP1 LDGKPLPYQE-----HRYLHRQVAAVGQEPQVFGRLQENIAYGLTQKPTMEEITAAAVKSGAHSFISGLPQG
 mCFTR-NBD1 -----IIKHSGRVSFCSQFSWIMPGTIKENIIFGV--SYDEYRYKSVVKACQLQDDITKFAEQ
 ABCB1-MDR1 VDGQDIRTIN-----VRFLREIIGVVSQEPVLFAATTIAENIRYGR-ENVMTDEIEKAVKEANAYDFIMKLPHK
 ABCC1-MRP1 -----HVAIKGSVAYVPQQAWIQNDLRENILFGC--QLEEPYYSVIQACALLPDLEILPSS
 ABCC2-MRP2 -----HITIKGTTAYVPQQSWIQNGTIKDNILFGT--EFNEKRYQQVLEACALLPDLEMLPGG
 ABCC3-MRP3 -----KVHMKGSVAYVPQQAWIQNDLQENVLFGK--ALNPKRYQQTLEACALLADLEMLPGG
 ABCC4-MRP4 -----LVSVHGRIAYVSQQPWFVSGTLRSNIFLFGK--KYEKERYEKVIKACALKKDLQLLEDG
 ABCC5-MRP5 -----SIAISGTFAYVAQQAWIQNDLRSNIFLFGK--EYDEERYNSVLNSCCLRPDLAILPSS
 ABCC6-MRP6 -----FVSIEGAVAYVPQEAQWQNTSVVENVCFGG--ELDPPWLERVLEACALQPDVDSFPEG
 ABCC7-CFTR -----KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGV--SYDEYRYRSVIKACQLEEDISKFAEK
 ABCC11-MRP8 -----SVGVQGSLAYVPQQAWIQNDLQENVLFGK--AYDKARYLQVLHCCSLNRDLLELPFG
 YCF1 -----FATVHGSVAYVSQVPWIMNGTVKENILFGH--RYDAEFYEKTIKACALTIDLAILMDG
 BPT1 PK-----LIIRSSSVAYCSQESWIMNASVRENILFGH--KFDQDYYDLTIKACQLLPDLKILPDG
 YBT1 LEPRQELIVD-----ANGTNSIAYCSQAQWLLNDTVKNNILFNS--PFNEARYKAVVEACGLKRDFEILKAG
 VMR1 LEPKHLIPD-----CEGLTNSFAYCSQAQWLLNDTVKNNILFNS--FYNEADRYKNVIDACGLKRDLLEIPAG
 NFT1 VESRDLEIG-----KDGMTNSMAYCSQTPWLISGTIKDNVVFGE--IFNKQKFDVVMKSCCLDKDIKAMTAG
 YOR1 -----KVEVNGDLLMCG-YPWIQNASVRDNIIFGS--PFNKEKYDEVVRVCSLKADLDILPAG
 boucle Q

HisP DERAQGYKYPVHLGGGQQRVSIALARALAMEPDVLLFDEPTSAIDPELVGEVLRIMQ--QLAEE-GKTMVVVTHEMGFAR
 MJ0796 EERFANHKNQ LGGGQQRVAIARALANNPPILADEPTGALDSKTGEKIMQLLK--KLNEEDGKTVVVTHDINVAR
 TAP1 YDTEVDEAGSLGGGQQRVAVALARALIRKPCVLILDDATSAIDANS--QLQVEQLLYESPERYSRVLLITQHLSLVE
 mCFTR-NBD1 DNTVLGEGGVTLGGGQQRISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVFTFEEQVFESCV---CKLMANKTRILVTSKMEHLR
 ABCB1-MDR1 FDTLVGERGAQLGGGQQRISLARALVRNPKILLDEATSAIDTES--EAVVQVALDKA--RKGRTTIVIAHRLSTVR
 ABCC1-MRP1 DRTEIGEGGVNLGGGQQRISLARAVYSNADTYLLDDPLSAVDAAHVGHKHFENVI-GPNGLLKNKTKVLATNKSVALS
 ABCC2-MRP2 DLAEIGEGGINLGGGQQRISLARATYQNLDTYLLDDPLSAVDAAHVGHKHFENVI-GPNGLLKNKTKVLATNKSVALS
 ABCC3-MRP3 DQTEIGEGGINLGGGQQRISLARAVYSDADTYLLDDPLSAVDAAHVGHKHFENVI-GPEGVLGKTRVLVTHGIFSLP
 ABCC4-MRP4 DLTIVIGDRGTTLGGGQQRISLARAVYQDADTYLLDDPLSAVDAAVSRHFLFELCI--CQILHEKITILVTHQLQYLV
 ABCC5-MRP5 DLTEIGEGGANLGGGQQRISLARAVYSNADTYLLDDPLSAVDAAHVGHKHFENVI-GPNGLLKNKTKVLATNKSVALS
 ABCC6-MRP6 IHTSIGEQGMNLGGGQQRISLARAVYRKAAYLLDDPLAALDAHVGHQHFENQVI-GPGGLLQGTTRILVTHALHILP
 ABCC7-CFTR DNIVLGEIGGITLGGGQQRISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTKEIFEESCV---CKLMANKTRILVTSKMEHLK
 ABCC11-MRP8 DMTEIGERGLNLGGGQQRISLARAVYSDRQTYLLDDPLSAVDAAHVGHKHFEECI-KKT--LRGKTVVVTHQLQYLE
 YCF1 DKTIVGEKGNLGGGQQRISLARAVYSNADTYLLDDPLSAVDAAHVGHKHFENVI-GPNGLLKNKTKVLATNKSVALS
 BPT1 DETLVGEKGISLGGGQQRISLARAVYSRADTYLLDDPLSAVDAAVSKNIEYVLIGKTALLKNKTIILTTNTVSILK
 YBT1 DLTEIGEGGITLGGGQQRISLARALYSNARHVLLDDCLSAVDSHTASWIYDNCI--TGPLMEDRTCILVSHNIALTL
 VMR1 DLTEIGEGKITLGGGQQRISLARAVYSSAKHVLLDDCLSAVDSHTAVWIYENCI--TGPLMKNRTCILVTHNVSILT
 NFT1 IRTDVGDGGFSLGGGQQRISLARALYSNADTYLLDDCLSAVDPETALYIYEEL--CGPMMKGRCTIITSHNISLVT
 YOR1 DMTEIGERGITLGGGQQRINLARSVYKKKIDTYLLDDPLSAVDSRVGKHIMDECL--TGMLANKTRILATHQLSLIE
 signature ABC Walker B boucle H

HisP HVSSHVIFLHQGKIEEGDPEQVFGNPQSPRLQQFLKGSLLKLEH----- 262
 MJ0796 FG-ERIIYLDGGEVERE-----EKLGRGFDDR----- 235
 TAP1 Q-ADHILFLEGGAIREGGTHQQLMEKKGCYAMVQAPADAPE----- 748
 mCFTR-NBD1 K-ADKILILHQGSSYFYGTFSQLSLRPDSSKLMGYDTFDQFTEERRSSILTETLRRFSVDD---- 674
 ABCB1-MDR1 N-ADVIAFGDDGVIVEKGNHDELMKEKGIYFKLVMTQTAGNEVEL----- 636
 ABCC1-MRP1 Q-VDVIIVMSSGGKISEMGSYQELLARDGAFAEFLRTYA-STEQEQAEEEN----- 881
 ABCC2-MRP2 Q-VDEIVVLGNGTIVEKGSYALLAKKGEFAKNLKTFLRHTGPEEEATVH----- 875
 ABCC3-MRP3 Q-TDFIIVLADGVSEMGYPALLQRNGSFANFLCNYA-PDEDQGHLEDS----- 864
 ABCC4-MRP4 A-ASQILILKDGKMGVQKGTYTEFLKSGIDFGSLLK----- 632
 ABCC5-MRP5 D-CDEVIFMKEGCITERGTHEELMNLNGDYATIFNNLLG----- 787
 ABCC6-MRP6 Q-ADWIIVLANGAIAEMGSYQELLQRKGVLCVLDQAR-QPGDRGEGE----- 864
 ABCC7-CFTR K-ADKILILHEGSSYFYGTFSQLSLRPDSSKLMGCDSDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGDAPVS 678
 ABCC11-MRP8 F-CGQIILLENGKICENGTHSELMQKKGKYAQLIQKMH----- 734
 YCF1 I-ADSIALLDNGEITQGGTYDEIT--KDADSPLWKLLNNYK-KNNGKSN----- 864
 BPT1 H-SQMIYALENGIEVEQGNIEDVMNRKNNTSKLKLLEEFDSPIDNGNES----- 885
 YBT1 RNAELVVLLEDGRVKDQGDPIDMLQKGLFGEDELVKSSILSRANS----- 944
 VMR1 RNAHFIVLENGKVKNQGTITELQSKGLFKEK----- 904
 NFT1 KRADWLIVLDGRGEVKSQGGKPSDLIKSNEFLRES----- 889
 YOR1 R-ASRVIVLGTGQVDIGTVDELKARNQTLINLLQFSSQNSEKEDE----- 818
 ↑ ↑

HisP 1 -----MMSENKLHVIDLHKRYGGHE--VLKGVSLQARAGDVISII**GSSGSGKS**TFLRCINFLEKPKSEGAIIVN
 MJ0796 1 -----MIKLKNVTYKMGEEIIALKNVNLKEIGFVSIM**GPSGSGKS**TMLNIIGCLDKPTEGEVYID
 TAP1 489 PPSGLLTPLHLEGLVQFDQVSFAYPNRPDVLVLQGLTFTLRPEVTALV**PGNSGSGKS**TVAAALLQNLQYPTQGQVLLD
 ABCB1-MDR1 1022 --TEGLMPNTLEGNVTFGEVVFNYPTRPDIPVLQGLSEVKKGQTLALV**GSSGCGKS**TVVQLLERFYDPLAGKVLLD
 ABCC1-MRP1 1281 --TAPSSWPQVGRVEFRNYLRKYREDL-DFVLRHINVTINKEGKGV**GRTGAGKS**SLTLGLFRINESAGEEIIID
 ABCC2-MRP2 1288 --KRPPDPWSPKGKIQFNFYQVRYRPEL-DLVLRGITCDIGSMKIGVV**GRTGAGKS**SLTNCLFRILEAAGQIIID
 ABCC3-MRP3 1277 --SRPEGWPPRGEVIFRNYSVRYRPLG-DLVLRLDSLHVHGGEKVGIV**GRTGAGKS**SMTLCLFRILEAAKEIRID
 ABCC4-MRP4 1029 --KRPPPAWPHEGVIIIFDNVNFMYSPGG-PLVLKHLTALIKSQEKVGIV**GRTGAGKS**SLISALFRLSE-PEGKIWID
 ABCC5-MRP5 1181 --KAPSDWPQGEVTFENAEMYRYREN-PLVLKKVSTFIKPKKEIGIV**GRTGSGKS**SLGMAFLRLVELSGGCIKID
 ABCC6-MRP6 1253 --CAAQPWPQGGQIEFRDGLRYRPEL-PLAVQGVSFKHAGKGVIV**GRTGAGKS**SLASGLLRLQEAEEGWIID
 ABCC7-CFTR 1198 --VKKDDIWPSSGGMQTVKDLTAKYTEGG-NAILENISFSISPEQVRGLL**GRTGSGKS**TLLSAFLRLLN-TEGEIQID
 ABCC11-MRP8 1129 --TSCPQGWPPQHGEIIFQDYHMKYRDNT-PTVLHGINTLIRGHEVVGVIV**GRTGSGKS**SLGMALFRLVEPMAGRILID
 YCF1 1260 --HRPPKEWSPQGDIFKNFYSTRYPEL-DVLVKHINTHIKPNEKVGIV**GRTGAGKS**SLTLALFRMTEASEGNIVID
 BPT1 1290 --KRPDENWSPKGGIEFKNYSTRYREN-DPVLNNINVKIEPCKVGIV**GRTGAGKS**TLSLALFRILEPTEGKIID
 YBT1 1369 --EIPPPQWPQDGKIEVNDLSLRYAPNL-PRVKNVSFSDVADQKIGIV**GRTGAGKS**TIITALLFRFLEPETGHIKID
 VMR1 1311 --LLNEPSWPKDGEIEIENLSLRYAPNL-PPVIRNVSFKVDPQSKIGIV**GRTGAGKS**TIITALLFRFLEPETGHIKID
 NFT1 1273 --ISPPANWPKQDVLEKLNLSLRYSPHS-SKALDNVSFKVKAGTKVGIV**GRTGAGKS**SIIAAIYRLSDWENGTITID
 YOR1 1201 --MTPPENSWPSMGEIIFENVDFAYRPLG-PIVLKNLNLNIKSGEKIGIC**GRTGAGKS**TIMSALYRLNELTAGKILID

↑ ↑ ↑ résidu aromatique Walker A

HisP
MJ0796
TAP1
ABCB1-MDR1
ABCC1-MRP1
ABCC2-MRP2
ABCC3-MRP3
ABCC4-MRP4
ABCC5-MRP5
ABCC6-MRP6
ABCC7-CFTR
ABCC11-MRP8
YCF1
BPT1
YBT1
VMR1
NFT1
YOR1

QGNINLVRDKDGLKVADKNQLRLRLRRLTMV**FQHFNLWS**---HMTVLENVMEAPIQVLG--LSKHD----ARERALK
NIKTNDLDDDE-----LTKIRRDKIGVF**FQQFNLP**I---LLTALENVLPFIKYRGAMSGEE----RRKRALE
GKPLPQYEHDE-----LHRQVAAG**GQEPQV**FGSRSLQENIAYG-LTQKPTMEEITAABV---KSGAHSFIS
GKEIKRLNVQW-----LRAHLGIV**SQEPIL**FDSCIAENIAYGDNSRVVSQEEIVRAAK--EANIHFATIE
GINIAKIGLHD-----LRFKITII**PQDPVL**FSGSLRMLNLDPFSSQYSDEEVWTSLEL-----AHLKDFVS
GVDIASIGLHD-----LREKLTII**PQDPIL**FSGSLRMLNLDPFNNGSDEEIKWALEL-----AHLKSFVA
GLNVADIGLHD-----VRSQLTII**PQDPIL**FSGTLRMLNLDPFQSYSEEDIKWALEL-----SHLHTFVS
KILTTEIGLHD-----LRKKMSII**PQEPVL**FTGTRKMLNLPFKEHTDEELWNALQE-----VQLKETIE
GVRTSIDIGLHD-----LRSKLSII**PQEPVL**FSGTVRSNLDPFNQYTEDQIWDALER-----THMKECIA
GVPIAHVGLHT-----LRSRSIIE**PQDPIL**FGSLRMLNLDLQHSDEAIWAALET-----VQLKALVA
GVSWSITLQQ-----WRKAFGVI**PQKVFI**SGFTFRKNLDPEYQWSDQEIWKVADAEVG-----LRSVIE
GVDICSIGLED-----LRSKLSVI**PQDPVLL**SGTIRFNLDPFDRHTDQQIWDALER-----TFLTKAIS
NIAINIEIGLYD-----LRHKLSII**PQDSQV**FEGTVRENIDPINQYDEATWRALEL-----SHLKEHVL
GIDISDIGLFD-----LRSHLAIIE**PQDAQAF**EGTVKTNLDPFNRYSEDELKRAVEQ-----AHLKPHLE
NIDISGVDLQR-----LRRSITII**PQDPTL**FSGTIKTNLDPFYDFSDRQIFEALKRVNLISEEQQLQQGAT
GQDISKIDLVT-----LRRSITII**PQDPIL**FAGTIKSNVDPPYDEYDEKKIFKALSQVNLISSHEFEFVNLN
NKDKIHIPLER-----LRNSISCI**PQDPTL**FDGTVRSNLDPFDRYSDVQYGVLSKVGLIEECDELCLIF
NVDISQGLLFD-----LRRKLAIIE**PQDPVLF**RGTIRKNLDPFNERTDDELWDALVRGGAIAKDDLPEVKL

boucle 9

HisP
MJ0796
TAP1
ABCB1-MDR1
ABCC1-MRP1
ABCC2-MRP2
ABCC3-MRP3
ABCC4-MRP4
ABCC5-MRP5
ABCC6-MRP6
ABCC7-CFTR
ABCC11-MRP8
YCF1
BPT1
YBT1
VMR1
NFT1
YOR1

LAEE-GKTMVVVTHEMGFARHVSSHVIFLHQGKIEEGDPEQVFGNPQSPRLQQFLKGLSKKLEH-----
LNEEDGKTVVVVTHDINVARFG-ERIIYLDGVEVER-----EKLRGFDDR-----
SPERYSRVLLITQHLSLVLEQA-DHILFLEGGAIREGGTHQQLMEKKGCYWAMVQAPADAPE-----
ARE--GRTCIVIAHRLSTIQNA-DLIVVFQNGRVKEHGTHQQLLAAQKGIYFMSVSVQAGTKRQ-----
QFE--DCTVLTIAHRLNTIMDY-TRKVLVDKGEIQYGAESDQLLQQR-GLFYFMAKMDAGLV-----
EFA--HCTVTITIAHRLHTIMDS-DRKVMVLNDNGKIECGSPSELLQIP-GPFYFMAKEAGIENVNSTKF-----
QFD--TCTVLTIAHRLNTIMDY-TRVLVLDKGVVAEFDSPANLIAAR-GIFYGMARDAGLA-----
KFA--HCTVLITIAHRLNTIIDS-DKIMVLDSGRLKKEYDEPVYLLQNKESLIFYKMVQQLGKAEEAALTETAKQVYFKRN-----
AFA--DCTMLTIAHRLHTVLGS-DRIMVLAQGQGVVEFDTPSVLLSNDSSRFYAMFAA-----ENKVAVKG-----
WFA--QCTVLLIAHRLRSVMDCA-ARVLVMDKQGVAESGPAQLLAAQK-GLFYRLAQESGLV-----
AFA--DCTVILCEHRIEAMLEC-QQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNER-SLFRQAISPSDRVKLFPHRNSKCKSKPQI-----
AFQ--GCTVLVIAHRVTTVLNC-DHILVMGNGKVVFEFDRPEVLRKKPGSLFAALMATA---TSSLR-----
AFK--DRTILTIAHRLNTIMDS-DRIIVLDNGKVAEFDSPGQLLSDNKSLSFYSLCMEAGLVNEN-----
EFK--DRTILTIAHRIDTVLDS-DKIIVLDQGSVREFDSPSKLLSDKTSIFYSLCEKGGYL-----
EFQ--GSTILTIAHRLRSVIDY-DKILVMDAGEVKEYDHPYSLLLNKQSAFYSMCEHSGELDILIELAKKAFVEKLNS-----
EFN--KSTILTIAHRLRSVIDY-DRIIVMDAGEVKEYDRPSELLKDERGIFYSMCRDSSGGLLELLKQIAKQS--SKMMK-----
TMK--NTTILTIAHRLRSVIDY-DKILVMEGRVKEYDHPYTLISDRNTIFYRLCRQSGEFENLFELAKVSFDNKR--
EFG--DCTILCIAHRLKTI VNY-DRILVLEKGEVAEFDTPWTLFSQEDSIFRSMCSRSRGIVENDFENR-----

boucle H

↑

HisP	-----	262
MJ0796	-----	235
TAP1	-----	748
ABCB1-MDR1	-----	1279
ABCC1-MRP1	-----	1531
ABCC2-MRP2	-----	1545
ABCC3-MRP3	-----	1527
ABCC4-MRP4	YPHIGHTDHMTNTSNGQPSTLTIFETAL	1325
ABCC5-MRP5	-----	1437
ABCC6-MRP6	-----	1503
ABCC7-CFTR	AALKEETEEEVQDTRL-----	1480
ABCC11-MRP8	-----	1382
YCF1	-----	1515
BPT1	-----	1559
YBT1	KKD-----	1661
VMR1	-----	1592
NFT1	-----	1558
YOR1	-----	1477

Références bibliographiques

- [Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA.](#) (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor : a regulator of insulin secretion. *Science* **268** : 423-426.
- [Alani E, Lee JY, Schofield MJ, Kijas AW, Hsieh P, Yang W.](#) (2003) Crystal structure and biochemical analysis of the MutS.ADP.beryllium fluoride complex suggests a conserved mechanism for ATP interactions in mismatch repair. *J Biol Chem.* **278** : 16088-16094.
- [Albers SV, Koning SM, Konings WN, Driessen AJ.](#) (2004) Insights into ABC transport in archaea. *J Bioenerg Biomembr.* **36** : 5-15.
- [Aleksandrov AA, Chang X, Aleksandrov L, Riordan JR.](#) (2000) The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol.* **528.2** : 259-265.
- [Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB, Riordan JR.](#) (2002) The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J Biol Chem.* **277** : 15419-15425.
- [Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M.](#) (1996) Characterization of the human ABC superfamily : isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet.* **5** : 1649-1655.
- [Al-Shawi MK, Polar MK, Omote H, Figler RA.](#) (2003) Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J Biol Chem.* **278** : 52629-52640.
- [Al-Shawi MK, Senior AE.](#) (1993) Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *J Biol Chem.* **268** : 4197-4206.
- [Al-Shawi MK, Urbatsch IL, Senior AE.](#) (1994) Covalent inhibitors of P-glycoprotein ATPase activity. *J Biol Chem.* **269** : 8986-8992.
- [Ambudkar SV, Cardarelli CO, Pashinsky I, Stein WD.](#) (1997) Relation between the turnover number for vinblastine transport and for vinblastine-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. *J Biol Chem.* **272** : 21160-21166.
- [Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM.](#) (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **39** : 361-398.
- [Ambudkar SV, Lelong IH, Zhang J, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I.](#) (1992) Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump : characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89** : 8472-8476.
- [Annereau JP, Ko YH, Pedersen PL.](#) (2003) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: the NBF1+R (nucleotide-binding fold 1 and regulatory domain) segment acting alone catalyses a $\text{Co}^{2+}/\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity markedly inhibited by both Cd^{2+} and the transition-state analogue orthovanadate. *Biochem J.* **371** : 451-462.
- [Armstrong S, Tabernero L, Zhang H, Hermodsen M and Stauffacher P.](#) (1998) Powering the ABC transporters : the 2.5 Å crystal structure of the ABC domain of RBSA. *Pediatr. Pulmonol.* **17** : 91-92.
- [Azzaria M, Schurr E, Gros P.](#) (1989) Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol.* **9** : 5289-5297.

- [Bakos E, Klein I, Welker E, Szabo K, Muller M, Sarkadi B, Varadi A.](#) (1997) Characterization of the human multidrug resistance protein containing mutations in the ATP-binding cassette signature region. *Biochem J.* **323** : 777-783.
- [Balzi E, Chen W, Ulaszewski S, Capieaux E, Goffeau A.](#) (1987) The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **262** : 16871-16879.
- [Balzi E, Wang M, Leterme S, Van Dyck L, Goffeau A.](#) (1994) PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J Biol Chem.* **269** : 2206-2214.
- [Barroga CF, Zhang H, Wajih N, Bouyer JH, Hermodson MA.](#) (1996) The proteins encoded by the *rbs* operon of *Escherichia coli* : I. Overproduction, purification, characterization, and functional analysis of RbsA. *Protein Sci.* **5** : 1093-1099.
- [Batist G, Katki AG, Klecker RW Jr, Myers CE.](#) (1986) Selenium-induced cytotoxicity of human leukemia cells : interaction with reduced glutathione. *Cancer Res.* **46** : 5482-5485.
- [Bébian M, Lagniel G, Garin J, Touati D, Verméglio A, Labarre J.](#) (2002) Involvement of superoxide dismutases in the response of *Escherichia coli* to selenium oxides. *J Bacteriol.* **184** : 1556-1564.
- [Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, Kruh GD.](#) (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.* **62** : 6172-6177.
- [Benabdelhak H, Schmitt L, Horn C, Jumel K, Blight MA, Holland IB.](#) (2005) Positive co-operative activity and dimerization of the isolated ABC ATPase domain of HlyB from *Escherichia coli*. *Biochem J.* **386** : 489-495.
- [Berger AL, Ikuma M, Welsh MJ.](#) (2005) Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** : 455-460.
- [Berkower C, Michaelis S.](#) (1991) Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *EMBO J.* **10** : 3777-3785.
- [Binnie RA, Zhang H, Mowbray S, Hermodson MA.](#) (1992) Functional mapping of the surface of *Escherichia coli* ribose-binding protein : mutations that affect chemotaxis and transport. *Protein Sci.* **1** : 1642-1651.
- [Birnboim HC, Doly J.](#) (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** : 1513-1523.
- [Bishop L, Agbayani R Jr, Ambudkar SV, Maloney PC, Ames GE.](#) (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 6953-6957.
- [Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.](#) (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277** : 1453-1474.
- [Bliss JM, Garon CF, Silver RP.](#) (1996) Polysialic acid export in *Escherichia coli* K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. *Glycobiology* **6** : 445-452.
- [Borths EL, Locher KP, Lee AT, Rees DC.](#) (2002) The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 16642-16647.

- [Boscoboinik D, Debanne MT, Stafford AR, Jung CY, Gupta RS, Epand RM.](#) (1990) Dimerization of the P-glycoprotein in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1027** : 225-228.
- [Boujaoude LC, Bradshaw-Wilder C, Mao C, Cohn J, Ogretmen B, Hannun YA, Obeid LM.](#) (2001) Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid : modulation of cellular activity of sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem.* **276** : 35258-35264.
- [Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D.](#) (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem.* **271** : 15091-15098.
- [Bullis BL, Li X, Singh DN, Berthiaume LG, Fliegel L.](#) (2002) Properties of the Na⁺/H⁺ exchanger protein. Detergent-resistant aggregation and membrane microdistribution. *Eur J Biochem.* **269** : 4887-4895.
- [Buyse F, Vandenbranden M, Ruysschaert JM.](#) (2004) Mistargeted MRPΔF728 mutant is rescued by intracellular GSH. *FEBS Lett.* **578** : 145-151.
- [Callaghan R, Berridge G, Ferry DR, Higgins CF.](#) (1997) The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface. *Biochim Biophys Acta* **1328** : 109-124.
- [Callahan HL, Beverley SM.](#) (1991) Heavy metal resistance : a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem.* **266** : 18427-18430.
- [Campbell JD, Biggin PC, Baaden M, Sansom MS.](#) (2003) Extending the structure of an ABC transporter to atomic resolution : modeling and simulation studies of MsbA. *Biochemistry* **42** : 3666-3673.
- [Carrier I, Julien M, Gros P.](#) (2003) Analysis of catalytic carboxylate mutants E552Q and E1197Q suggests asymmetric ATP hydrolysis by the two nucleotide-binding domains of P-glycoprotein. *Biochemistry* **42** : 12875-12885.
- [Chami M, Steinfels E, Orelle C, Jault JM, Di Pietro A, Rigaud JL, Marco S.](#) (2002) Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol.* **315** : 1075-1085.
- [Champeil P, Menguy T, Soulie S, Juul B, de Gracia AG, Rusconi F, Falson P, Denoroy L, Henao F, le Maire M, Moller JV.](#) (1998) Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Nucleotide- and metal-binding sites. *J Biol Chem.* **273** : 6619-6631.
- [Chang G, Roth CB.](#) (2001) Structure of MsbA from *E. coli* : a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293** : 1793-1800.
- [Chang G.](#) (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera* : a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol.* **330** : 419-430.
- [Chang XB, Hou YX, Riordan JR.](#) (1997) ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem.* **272** : 30962-30968.
- [Chaudhuri B, Ingavale S, Bachhawat AK.](#) (1997) *apd1*⁺, a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis : a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics* **145** : 75-83.
- [Chaudiere J, Courtin O, Leclaire J.](#) (1992) Glutathione oxidase activity of selenocystamine : a mechanistic study. *Arch Biochem Biophys.* **296** : 328-336.
- [Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB.](#) (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47** : 381-389.

- [Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quioco FA.](#) (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* **12** : 651-661.
- [Chen M, Abele R, Tampe R.](#) (2004) Functional non-equivalence of ATP-binding cassette signature motifs in the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem.* **279** : 46073-46081.
- [Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E, Kruh GD.](#) (2005) Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol.* **67** : 545-557.
- [Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE.](#) (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63** : 827-834.
- [Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S.](#) (2001) Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* **410** : 94-97.
- [Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Leshner JL Jr, Park HK, Sanders BB Jr, Smith CL, Taylor JR.](#) (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA.* **276** : 1957-1963.
- [Cohen E, Goldshleger R, Shainskaya A, Tal DM, Ebel C, le Maire M, Karlish SJ.](#) (2005) Purification of Na⁺,K⁺-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J Biol Chem.* **280** : 16610-16618.
- [Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG.](#) (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258** : 1650-1654.
- [Combs GF Jr, Clark LC, Turnbull BW.](#) (2001) An analysis of cancer prevention by selenium. *Biofactors* **14** : 153-159.
- [Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A.](#) (1998) Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 9831-9836.
- [Cotten JF, Ostedgaard LS, Carson MR, Welsh MJ.](#) (1996) Effect of cystic fibrosis-associated mutations in the fourth intracellular loop of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **271** : 21279-21284.
- [Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG.](#) (1991) A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol.* **113** : 1033-1042.
- [Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D.](#) (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol.* **55** : 929-937.
- [Cui Z, Hirata D, Tsuchiya E, Osada H, Miyakawa T.](#) (1996) The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *J Biol Chem.* **271** : 14712-14716.
- [Dardel F.](#) (1994) MC-Fit : using Monte-Carlo methods to get accurate confidence limits on enzyme parameters. *Comput Appl Biosci.* **10** : 273-275.
- [Daumke O, Knittler MR.](#) (2001) Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains. *Eur J Biochem.* **268** : 4776-4786.

- [Davidson AL, Chen J.](#) (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem.* **73** : 241-268.
- [Davidson AL, Chen J.](#) (2005) Structural biology. Flipping lipids : is the third time the charm ? *Science* **308** : 963-965.
- [Davidson AL, Laghaeian SS, Mannering DE.](#) (1996) The maltose transport system of *Escherichia coli* displays positive cooperativity in ATP hydrolysis. *J Biol Chem.* **271** : 4858-4863.
- [Davidson AL, Sharma S.](#) (1997) Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179** : 5458-5464.
- [Davis RL, Spallholz JE.](#) (1996) Inhibition of selenite-catalyzed superoxide generation and formation of elemental selenium (Se⁰) by copper, zinc, and aurointricarboxylic acid (ATA). *Biochem Pharmacol.* **51** : 1015-1020.
- [De Freitas JM, Kim JH, Poynton H, Su T, Wintz H, Fox T, Holman P, Loguinov A, Keles S, van der Laan M, Vulpe C.](#) (2004) Exploratory and confirmatory gene expression profiling of *mac1Δ*. *J Biol Chem.* **279** : 4450-4458.
- [Dean M, Hamon Y, Chimini G.](#) (2001a) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* **42** : 1007-1017.
- [Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R.](#) (2001b) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11** : 1156-1166.
- [Decottignies A, Goffeau A.](#) (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet.* **15** : 137-145.
- [Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB, Goffeau A.](#) (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem.* **273** : 12612-12622.
- [Decottignies A, Kolaczowski M, Balzi E, Goffeau A.](#) (1994) Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J Biol Chem.* **269** : 12797-12803.
- [Decottignies A, Lambert L, Catty P, Degand H, Epping EA, Moye-Rowley WS, Balzi E, Goffeau A.](#) (1995) Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane. *J Biol Chem.* **270** : 18150-18157.
- [Dey S, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM, Ambudkar SV.](#) (1997) Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 10594-10599.
- [Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vornheim C, Boos W, Welte W.](#) (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J.* **19** : 5951-5961.
- [Druley TE, Stein WD, Roninson IB.](#) (2001) Analysis of MDR1 P-glycoprotein conformational changes in permeabilized cells using differential immunoreactivity. *Biochemistry* **40** : 4312-4322.
- [Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF Jr, Slate EH, Fischbach LA, Marshall JR, Clark LC.](#) (2002) Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **11** : 630-639.
- [Ejendal KF, Hrycyna CA.](#) (2005) Differential sensitivities of the human ATP-binding cassette transporters ABCG2 and P-glycoprotein to cyclosporin A. *Mol Pharmacol.* **67** : 902-911.

- [Eraso P, Martinez-Burgos M, Falcon-Perez JM, Portillo F, Mazon MJ.](#) (2004) Ycf1-dependent cadmium detoxification by yeast requires phosphorylation of residues Ser908 and Thr911. *FEBS Lett.* **577** : 322-326.
- [Eytan GD, Regev R, Assaraf YG.](#) (1996) Functional reconstitution of P-glycoprotein reveals an apparent near stoichiometric drug transport to ATP hydrolysis. *J Biol Chem.* **271** : 3172-3178.
- [Falcon-Perez JM, Mazon MJ, Molano J, Eraso P.](#) (1999) Functional domain analysis of the yeast ABC transporter Ycf1p by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* **274** : 23584-23590.
- [Fecker L, Braun V.](#) (1983) Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **156** : 1301-1314.
- [Ferreira-Pereira A, Marco S, Decottignies A, Nader J, Goffeau A, Rigaud JL.](#) (2003) Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J Biol Chem.* **278** : 11995-11999.
- [Fetsch EE, Davidson AL.](#) (2002) Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 9685-9690.
- [Ganther HE.](#) (1968) Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* **7** : 2898-2905.
- [Ganther HE.](#) (1971) Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry* **10** : 4089-4098.
- [Gao M, Cui HR, Loe DW, Grant CE, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG.](#) (2000) Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem.* **275** : 13098-13108.
- [Garrigues A, Escargueil AE, Orlowski S.](#) (2002a) The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 10347-10352.
- [Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferte J, Garrigos M, Andre F, Orlowski S.](#) (2002b) Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol.* **62** : 1288-1298.
- [Gartner J, Moser H, Valle D.](#) (1992) Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat Genet.* **1** : 16-23.
- [Gaudet R, Wiley DC.](#) (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.* **20** : 4964-4972.
- [Geourjon C, Orelle C, Steinfels E, Blanchet C, Deleage G, Di Pietro A, Jault JM.](#) (2001) A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies. *Trends Biochem Sci.* **26** : 539-544.
- [Gharieb MM, Gadd GM.](#) (1998) Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance : vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. *Biometals* **11** : 101-106.
- [Ghosh M, Shen J, Rosen BP.](#) (1999) Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 5001-5006.
- [Gilson E, Alloing G, Schmidt T, Claverys JP, Dudler R, Hofnung M.](#) (1988) Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *EMBO J.* **7** : 3971-3974.
- [Goodno CC.](#) (1982) Myosin active-site trapping with vanadate ion. *Methods Enzymol.* **85** : 116-123.
- [Gottesman MM, Pastan I.](#) (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* **62** : 385-427.

- [Greller G, Horlacher R, DiRuggiero J, Boos W.](#) (1999) Molecular and biochemical analysis of MalK, the ATP-hydrolyzing subunit of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Biol Chem.* **274** : 20259-20264.
- [Gribble FM, Reimann F.](#) (2003) Sulphonylurea action revisited : the post-cloning era. *Diabetologia* **46** : 875-891.
- [Groeger W, Koster W.](#) (1998) Transmembrane topology of the two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in the uptake of siderophores, haem and vitamin B₁₂. *Microbiology* **144** : 2759-2769.
- [Gueldry O, Lazard M, Delort F, Dauplais M, Grigoras I, Blanquet S, Plateau P.](#) (2003) Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* **270** : 2486-2496.
- [Guilfoile PG, Hutchinson CR.](#) (1991) A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 8553-8557.
- [Guillon L, Schmitt E, Blanquet S, Mechulam Y.](#) (2005) Initiator tRNA Binding by e/aIF5B, the Eukaryotic/Archaeal Homologue of Bacterial Initiation Factor IF2. *Biochemistry* **44** : 15594-15601.
- [Haering CH, Schoffnegger D, Nishino T, Helmhart W, Nasmyth K, Lowe J.](#) (2004) Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell* **15** : 951-964.
- [Hagmann W, Nies AT, König J, Frey M, Zentgraf H, Keppler D.](#) (1999) Purification of the human apical conjugate export pump MRP2 reconstitution and functional characterization as substrate-stimulated ATPase. *Eur J Biochem.* **265** : 281-289.
- [Hanson BA, Lester RL.](#) (1980) The extraction of inositol-containing phospholipids and phosphatidylcholine from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. *J Lipid Res.* **21** : 309-315.
- [Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, Hermodson MA.](#) (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323** : 448-450.
- [Higgins CF, Linton KJ.](#) (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* **11** : 918-926.
- [Hikkel I, Lucau-Danila A, Delaveau T, Marc P, Devaux F, Jacq C.](#) (2003) A general strategy to uncover transcription factor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast. *J Biol Chem.* **278** : 11427-11432.
- [Hopfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG, Cole SP.](#) (1997) Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J Biol Chem.* **272** : 23623-23630.
- [Holland IB, Cole SPC, Kuchler K, Higgins CF.](#) (2003) ABC proteins : from Bacteria to Man. Academic Press (Elsevier). London.
- [Hoof T, Demmer A, Hadam MR, Riordan JR, Tumbler B.](#) (1994) Cystic fibrosis-type mutational analysis in the ATP-binding cassette transporter signature of human P-glycoprotein MDR1. *J Biol Chem.* **269** : 20575-20583.
- [Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA.](#) (2001) Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* **105** : 473-485.
- [Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA.](#) (2000) Structural biology of Rad50 ATPase : ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101** : 789-800.

- [Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD.](#) (2001) Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* **162** : 181-191.
- [Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD.](#) (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10) : resistance to docetaxel. *Cancer Res.* **64** : 4927-4930.
- [Hou YX, Riordan JR, Chang XB.](#) (2003) ATP binding, not hydrolysis, at the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance-associated protein MRP1 enhances ADP.Vi trapping at the second domain. *J Biol Chem.* **278** : 3599-3605.
- [Hountondji C, Schmitter JM, Beauvallet C, Blanquet S.](#) (1987) Affinity labeling of *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase at the binding site for tRNAPhe. *Biochemistry* **26** : 5433-5439.
- [Howard EM, Roepe PD.](#) (2003) Purified human MDR 1 modulates membrane potential in reconstituted proteoliposomes. *Biochemistry* **42** : 3544-3555.
- [Hrycyna CA, Ramachandra M, Ambudkar SV, Ko YH, Pedersen PL, Pastan I, Gottesman MM.](#) (1998) Mechanism of action of human P-glycoprotein ATPase activity. Photochemical cleavage during a catalytic transition state using orthovanadate reveals cross-talk between the two ATP sites. *J Biol Chem.* **273** : 16631-16634.
- [Hrycyna CA, Ramachandra M, Germann UA, Cheng PW, Pastan I, Gottesman MM.](#) (1999) Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry* **38** : 13887-13899.
- [Huang P, Liu Q, Scarborough GA.](#) (1998) Lysophosphatidylglycerol : a novel effective detergent for solubilizing and purifying the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Anal Biochem.* **259** : 89-97.
- [Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH.](#) (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396** : 703-707.
- [Hunke S, Mourez M, Jehanno M, Dassa E, Schneider E.](#) (2000) ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK₂) determined by site-directed chemical cross-linking. *J Biol Chem.* **275** : 15526-15534.
- [Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF.](#) (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346** : 362-365.
- [Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S.](#) (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* **16** : 1011-1017.
- [Janas E, Hofacker M, Chen M, Gompf S, van der Does C, Tampe R.](#) (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem.* **278** : 26862-26869.
- [Jidenko M, Nielsen RC, Sorensen TL, Moller JV, le Maire M, Nissen P, Jaxel C.](#) (2005) Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** : 11687-11691.
- [Jones PM, George AM.](#) (2002) Mechanism of ABC transporters : a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 12639-12644.
- [Jones PM, George AM.](#) (2004) The ABC transporter structure and mechanism : perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci.* **61** : 682-99.

- [Jovov B, Ismailov II, Berdiev BK, Fuller CM, Sorscher EJ, Dedman JR, Kaetzel MA, Benos DJ.](#) (1995) Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem.* **270** : 29194-29200.
- [Julien M, Gros P.](#) (2000) Nucleotide-induced conformational changes in P-glycoprotein and in nucleotide binding site mutants monitored by trypsin sensitivity. *Biochemistry* **39** : 4559-4568.
- [Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W.](#) (2001) Composite active site of an ABC ATPase : MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol Cell* **7** : 1-12.
- [Karcher A, Buttner K, Martens B, Jansen RP, Hopfner KP.](#) (2005) X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly. *Structure* **13** : 649-659.
- [Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, Hunt JF.](#) (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure* **9** : 571-586.
- [Katzmann DJ, Epping EA, Moye-Rowley WS.](#) (1999) Mutational disruption of plasma membrane trafficking of *Saccharomyces cerevisiae* Yor1p, a homologue of mammalian multidrug resistance protein. *Mol Cell Biol.* **19** : 2998-3009.
- [Katzmann DJ, Hallstrom TC, Mahe Y, Moye-Rowley WS.](#) (1996) Multiple Pdr1p/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding cassette transporter protein-encoding gene *PDR5*. *J Biol Chem.* **271** : 23049-23054.
- [Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Golin J, Volckaert G, Moye-Rowley WS.](#) (1995) Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (*YOR1*) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **15** : 6875-6883.
- [Kelly A, Powis SH, Kerr LA, Mockridge I, Elliott T, Bastin J, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Trowsdale J, Townsend A.](#) (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* **355** : 641-644.
- [Kerppola RE, Shyamala VK, Klebba P, Ames GE.](#) (1991) The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. Identification of the histidine permease HisQMP complex. *J Biol Chem.* **266** : 9857-9865.
- [Kerr ID, Berridge G, Linton KJ, Higgins CF, Callaghan R.](#) (2003) Definition of the domain boundaries is critical to the expression of the nucleotide-binding domains of P-glycoprotein. *Eur Biophys J.* **32** : 644-654.
- [Kerr ID.](#) (2002) Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochim Biophys Acta* **1561** : 47-64.
- [Kerr KM, Sauna ZE, Ambudkar SV.](#) (2001) Correlation between steady-state ATP hydrolysis and vanadate-induced ADP trapping in Human P-glycoprotein. Evidence for ADP release as the rate-limiting step in the catalytic cycle and its modulation by substrates. *J Biol Chem.* **276** : 8657-8664.
- [Kessi J, Hanselmann KW.](#) (2004) Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **279** : 50662-50669.
- [Kiser GL, Gentzsch M, Kloser AK, Balzi E, Wolf DH, Goffeau A, Riordan JR.](#) (2001) Expression and degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* **390** : 195-205.
- [Kitahara J, Seko Y, Imura N.](#) (1993) Possible involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol.* **67** : 497-501.

- [Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA, Sugiyama Y.](#) (1998) cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.* **433** : 149-152.
- [Klein I, Sarkadi B, Varadi A.](#) (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461** : 237-262.
- [Klein M, Mamnun YM, Eggmann T, Schuller C, Wolfger H, Martinoia E, Kuchler K.](#) (2002) The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett.* **520** : 63-67.
- [Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, Cole SP, Bear CE.](#) (2003) CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J.* **22** : 1981-1989.
- [Kolaczowski M, Kolaczowska A, Luczynski J, Witek S, Goffeau A.](#) (1998) *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb Drug Resist.* **4** : 143-158.
- [Kolaczowski M, van der Rest M, Cybularz-Kolaczowska A, Soumilion JP, Konings WN, Goffeau A.](#) (1996) Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem.* **271** : 31543-31548.
- [Konstas AA, Koch JP, Tucker SJ, Korbmacher C.](#) (2002) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K⁺ channels by the epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* **277** : 25377-25384.
- [Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P.](#) (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **57** : 3537-3547.
- [Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P.](#) (1999) Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* **59** : 175-182.
- [Koopmann JO, Post M, Neefjes JJ, Hammerling GJ, Momburg F.](#) (1996) Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur J Immunol.* **26** : 1720-1728.
- [Koronakis E, Hughes C, Milisav I, Koronakis V.](#) (1995) Protein exporter function and *in vitro* ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol Microbiol.* **16** : 87-96.
- [Kramer GF, Ames BN.](#) (1988) Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na₂SeO₃) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* **201** : 169-180.
- [Kreimer DI, Chai KP, Ferro-Luzzi Ames G.](#) (2000) Nonequivalence of the nucleotide-binding subunits of an ABC transporter, the histidine permease, and conformational changes in the membrane complex. *Biochemistry* **39** : 14183-14195.
- [Lacapère JJ, Bennett N, Dupont Y, Guillain F.](#) (1990) pH and magnesium dependence of ATP binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence that the catalytic ATP-binding site consists of two domains. *J Biol Chem.* **265** : 348-353.
- [Lamers MH, Georgijevic D, Lebbink JH, Winterwerp HH, Agianian B, de Wind N, Sixma TK.](#) (2004) ATP increases the affinity between MutS ATPase domains. Implications for ATP hydrolysis and conformational changes. *J Biol Chem.* **279** : 43879-43885.
- [Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK.](#) (2000) The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature* **407** : 711-717.
- [Lamers MH, Winterwerp HH, Sixma TK.](#) (2003) The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. *EMBO J.* **22** : 746-756.

- [Lammens A, Schele A, Hopfner KP.](#) (2004) Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. *Curr Biol.* **14** : 1778-1782.
- [Lankat-Buttgereit B, Tampe R.](#) (2002) The transporter associated with antigen processing : function and implications in human diseases. *Physiol Rev.* **82** : 187-204.
- [Lee JY, Urbatsch IL, Senior AE, Wilkens S.](#) (2002) Projection structure of P-glycoprotein by electron microscopy. Evidence for a closed conformation of the nucleotide binding domains. *J Biol Chem.* **277** : 40125-40131.
- [Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ, Muallem S.](#) (1999) Regulation of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J Biol Chem.* **274** : 3414-3421.
- [Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D.](#) (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C_4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem.* **269** : 27807-27810.
- [Lelong IH, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I.](#) (1994) GTP-stimulated phosphorylation of P-glycoprotein in transporting vesicles from KB-V1 multidrug resistant cells. *Biochemistry* **33** : 8921-8929.
- [Lerner-Marmarosh N, Gimi K, Urbatsch IL, Gros P, Senior AE.](#) (1999) Large scale purification of detergent-soluble P-glycoprotein from *Pichia pastoris* cells and characterization of nucleotide binding properties of wild-type, Walker A, and Walker B mutant proteins. *J Biol Chem.* **274** : 34711-34718.
- [Leslie EM, Deeley RG, Cole SP.](#) (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* **204** : 216-237.
- [Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X, Emtage S.](#) (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* **23** : 282-293.
- [Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Connors K, Condon B, Maloney PC, Guggino WB, Hunt JF, Emtage S.](#) (2005) Impact of the ΔF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem.* **280** : 1346-1353.
- [Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA.](#) (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae* : YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 42-47.
- [Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA.](#) (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem.* **271** : 6509-6517.
- [Linsdell P, Hanrahan JW.](#) (1998a) Adenosine triphosphate-dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Gen Physiol.* **111** : 601-614.
- [Linsdell P, Hanrahan JW.](#) (1998b) Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol.* **275** : C323-C326.
- [Linton KJ, Higgins CF.](#) (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol.* **28** : 5-13.
- [Liu CE, Liu PQ, Ames GE.](#) (1997) Characterization of the adenosine triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC transporter). *J Biol Chem.* **272** : 21883-21891.

- [Liu R, Sharom FJ.](#) (1996) Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry* **35** : 11865-11873.
- [Locher KP, Borths E.](#) (2004) ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS Lett.* **564** : 264-268.
- [Locher KP, Lee AT, Rees DC.](#) (2002) The *E. coli* BtuCD structure : a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296** : 1091-1098.
- [Locher KP.](#) (2004) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol.* **14** : 426-431.
- [Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.](#) (2002) The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing Walker A sequence. *J Biol Chem.* **277** : 41303-41306.
- [Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.](#) (2003a) Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains. *J Biol Chem.* **278** : 1575-1578.
- [Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.](#) (2003c) Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites. *J Biol Chem.* **278** : 50136-50141.
- [Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.](#) (2003b) Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem.* **278** : 39706-39710.
- [Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.](#) (2004) The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry* **43** : 12081-12089.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (1994) Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J Biol Chem.* **269** : 7750-7755.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (1995a) Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem.* **270** : 22957-22961.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (1995b) Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities. *J Biol Chem.* **270** : 21449-21452.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (1997) Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate. *J Biol Chem.* **272** : 31945-8.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (1999a) Identification of residues in the drug-binding domain of human P-glycoprotein. Analysis of transmembrane segment 11 by cysteine-scanning mutagenesis and inhibition by dibromobimane. *J Biol Chem.* **274** : 35388-35392.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (1999b) The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface. *J Biol Chem.* **274** : 24759-24765.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (2000) Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *J Biol Chem.* **275** : 39272-39278.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (2001a) Cross-linking of human multidrug resistance P-glycoprotein by the substrate, tris-(2-maleimidoethyl)amine, is altered by ATP hydrolysis. Evidence for rotation of a transmembrane helix. *J Biol Chem.* **276** : 31800-31805.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (2001b) Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem.* **276** : 14972-14979.

- [Loo TW, Clarke DM.](#) (2001c) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem.* **276** : 36877-36880.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (2002a) Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem.* **277** : 44332-44338.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (2002b) Vanadate trapping of nucleotide at the ATP-binding sites of human multidrug resistance P-glycoprotein exposes different residues to the drug-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 3511-3516.
- [Loo TW, Clarke DM.](#) (2005) Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem Biophys Res Commun.* **329** : 419-422.
- [Lowe J, Cordell SC, van den Ent F.](#) (2001) Crystal structure of the SMC head domain : an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *J Mol Biol.* **306** : 25-35.
- [Lucau-Danila A, Delaveau T, Lelandais G, Devaux F, Jacq C.](#) (2003) Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. *J Biol Chem.* **278** : 52641-52650.
- [Maki N, Hafkemeyer P, Dey S.](#) (2003) Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation. *J Biol Chem.* **278** : 18132-18139.
- [Manavalan P, Smith AE, McPherson JM.](#) (1993) Sequence and structural homology among membrane-associated domains of CFTR and certain transporter proteins. *J Protein Chem.* **12** : 279-290.
- [Manciu L, Chang XB, Buyse F, Hou YX, Gustot A, Riordan JR, Ruyschaert JM.](#) (2003) Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem.* **278** : 3347-3356.
- [Manley DM, McComb ME, Perreault H, Donald LJ, Duckworth HW, O'Neil JD.](#) (2000) Secondary structure and oligomerization of the *E. coli* glycerol facilitator. *Biochemistry* **39** : 12303-12311.
- [Mannering DE, Sharma S, Davidson AL.](#) (2001) Demonstration of conformational changes associated with activation of the maltose transport complex. *J Biol Chem.* **276** : 12362-12368.
- [Mao Q, Leslie EM, Deeley RG, Cole SP.](#) (1999) ATPase activity of purified and reconstituted multidrug resistance protein MRP1 from drug-selected H69AR cells. *Biochim Biophys Acta* **1461** : 69-82.
- [Mao Q, Scarborough GA.](#) (1997) Purification of functional human P-glycoprotein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1327** : 107-118.
- [Martin C, Berridge G, Higgins CF, Callaghan R.](#) (1997) The multi-drug resistance reversal agent SR33557 and modulation of vinca alkaloid binding to P-glycoprotein by an allosteric interaction. *Br J Pharmacol.* **122** : 765-771.
- [Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, Callaghan R.](#) (2000a) Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol.* **58** : 624-632.
- [Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R.](#) (2000b) Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* **39** : 11901-11906.
- [Martin C, Higgins CF, Callaghan R.](#) (2001) The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry* **40** : 15733-15742.

- [Mason DL, Mallampalli MP, Huyer G, Michaelis S.](#) (2003) A region within a luminal loop of *Saccharomyces cerevisiae* Ycf1p directs proteolytic processing and substrate specificity. *Eukaryot Cell* **2** : 588-598.
- [Mason DL, Michaelis S.](#) (2002) Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Biol Cell* **13** : 4443-4455.
- [McKeehan WL, Hamilton WG, Ham RG.](#) (1976) Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **73** : 2023-2027.
- [McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME.](#) (1996) Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 8083-8088.
- [Mellot P, Mechulam Y, Le Corre D, Blanquet S, Fayat G.](#) (1989) Identification of an amino acid region supporting specific methionyl-tRNA synthetase : tRNA recognition. *J Mol Biol.* **208** : 429-443.
- [Meyer TH, van Endert PM, Uebel S, Ehring B, Tampe R.](#) (1994) Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett.* **351** : 443-447.
- [Mimmack ML, Gallagher MP, Pearce SR, Hyde SC, Booth IR, Higgins CF.](#) (1989) Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems : stoichiometry of ATP hydrolysis during transport *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 8257-8261.
- [Mimura CS, Holbrook SR, Ames GF.](#) (1991) Structural model of the nucleotide-binding conserved component of periplasmic permeases. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 84-88.
- [Moncalian G, Lengsfeld B, Bhaskara V, Hopfner KP, Karcher A, Alden E, Tainer JA, Paull TT.](#) (2004) The Rad50 signature motif : essential to ATP binding and biological function. *J Mol Biol.* **335** : 937-951.
- [Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF, Thomas PJ.](#) (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem.* **277** : 21111-21114.
- [Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P.](#) (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361** : 726-730.
- [Mourez M, Hofnung M, Dassa E.](#) (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J.* **16** : 3066-3077.
- [Muller KM, Ebensperger C, Tampe R.](#) (1994) Nucleotide binding to the hydrophilic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem.* **269** : 14032-14037.
- [Naito M, Tsuruo T.](#) (1992) Functionally active homodimer of P-glycoprotein in multidrug-resistant tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **185** : 284-290.
- [Nakamura K, Niimi M, Niimi K, Holmes AR, Yates JE, Decottignies A, Monk BC, Goffeau A, Cannon RD.](#) (2001) Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* **45** : 3366-3374.
- [Natrajan G, Lamers MH, Enzlin JH, Winterwerp HH, Perrakis A, Sixma TK.](#) (2003) Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches : a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res.* **31** : 4814-4821.

- [Neumann L, Abele R, Tampe R.](#) (2002) Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Mol Biol.* **324** : 965-973.
- [Nijenhuis M, Hammerling GJ.](#) (1996) Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol.* **157** : 5467-5477.
- [Nikaido K, Ames GE.](#) (1999) One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in an ABC transporter, the histidine permease. *J Biol Chem.* **274** : 26727-26735.
- [Nikaido K, Liu PQ, Ames GE.](#) (1997) Purification and characterization of HisP, the ATP-binding subunit of a traffic ATPase (ABC transporter), the histidine permease of *Salmonella typhimurium*. Solubility, dimerization, and ATPase activity. *J Biol Chem.* **272** : 27745-27752.
- [Obis D, Guillot A, Gripon JC, Renault P, Bolotin A, Mistou MY.](#) (1999) Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol.* **181** : 6238-6246.
- [Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W.](#) (2000) Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* **407** : 703-710.
- [Ogawa A, Hashida-Okado T, Endo M, Yoshioka H, Tsuruo T, Takesako K, Kato I.](#) (1998) Role of ABC transporters in aureobasidin A resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **42** : 755-761.
- [Onda M, Ota K, Chiba T, Sakaki Y, Ito T.](#) (2004) Analysis of gene network regulating yeast multidrug resistance by artificial activation of transcription factors : involvement of Pdr3 in salt tolerance. *Gene* **332** : 51-59.
- [Orelle C, Dalmás O, Gros P, Di Pietro A, Jault JM.](#) (2003) The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J Biol Chem.* **278** : 47002-47008.
- [Orozco E, Lopez C, Gomez C, Perez DG, Marchat L, Banuelos C, Delgadillo DM.](#) (2002) Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int.* **51** : 353-359.
- [Ortiz DF, St Pierre MV, Abdulmessih A, Arias IM.](#) (1997) A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem.* **272** : 15358-15365.
- [Ose T, Fujie T, Yao M, Watanabe N, Tanaka I.](#) (2004) Crystal structure of the ATP-binding cassette of multisugar transporter from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Proteins* **57** : 635-638.
- [Ozvegy C, Varadi A, Sarkadi B.](#) (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem.* **277** : 47980-47990.
- [Painter EP.](#) (1941) The Chemistry and Toxicity of Selenium Compounds, with Special Reference to the Selenium Problem. *Chemical Reviews* **28** : 179-213.
- [Panagiotidis CH, Reyes M, Sievertsen A, Boos W, Shuman HA.](#) (1993) Characterization of the structural requirements for assembly and nucleotide binding of an ATP-binding cassette transporter. The maltose transport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **268** : 23685-23696.
- [Pascolo L, Petrovic S, Cupelli F, Bruschi CV, Anelli PL, Lorusso V, Visigalli M, Uggeri F, Tiribelli C.](#) (2001) ABC protein transport of MRI contrast agents in canalicular rat liver plasma vesicles and yeast vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun.* **282** : 60-66.
- [Patzlaff JS, van der Heide T, Poolman B.](#) (2003) The ATP /substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J Biol Chem.* **278** : 29546-29551.

- [Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP.](#) (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271** : 1126-1128.
- [Payen LF, Gao M, Westlake CJ, Cole SP, Deeley RG.](#) (2003) Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J Biol Chem.* **278** : 38537-38547.
- [Petrovic S, Pascolo L, Gallo R, Cupelli F, Ostrow JD, Goffeau A, Tiribelli C, Bruschi CV.](#) (2000) The products of *YCF1* and *YLL015w* (*BPT1*) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16** : 561-571.
- [Pinson B, Sagot I, Daignan-Fornier B.](#) (2000) Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **36** : 679-687.
- [Poruchynsky MS, Ling V.](#) (1994) Detection of oligomeric and monomeric forms of P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *Biochemistry* **33** : 4163-4174.
- [Qu Q, Russell PL, Sharom FJ.](#) (2003) Stoichiometry and affinity of nucleotide binding to P-glycoprotein during the catalytic cycle. *Biochemistry* **42** : 1170-1177.
- [Ramachandra M, Ambudkar SV, Chen D, Hrycyna CA, Dey S, Gottesman MM, Pastan I.](#) (1998) Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* **37** : 5010-5019.
- [Ramaen O, Masscheleyn S, Duffieux F, Pamlard O, Oberkamp M, Lallemand JY, Stoven V, Jacquet E.](#) (2003) Biochemical characterization and NMR studies of the nucleotide-binding domain 1 of multidrug-resistance-associated protein 1 : evidence for interaction between ATP and Trp653. *Biochem J.* **376** : 749-756.
- [Ramjeesingh M, Li C, Garami E, Huan LJ, Hewryk M, Wang Y, Galley K, Bear CE.](#) (1997) A novel procedure for the efficient purification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Biochem J.* **327** : 17-21.
- [Randak C, Auerswald EA, Assfalg-Machleidt I, Reenstra WW, Machleidt W.](#) (1999) Inhibition of ATPase, GTPase and adenylate kinase activities of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by genistein. *Biochem J.* **340** : 227-235.
- [Rayman MP.](#) (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* **356** : 233-241.
- [Rayman MP.](#) (2004) The use of high-selenium yeast to raise selenium status : how does it measure up ? *Br J Nutr.* **92** : 557-573.
- [Rebbeer JF, Connolly GC, Dumont ME, Ballatori N.](#) (1998a) ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *J Biol Chem.* **273** : 33449-33454.
- [Rebbeer JF, Connolly GC, Dumont ME, Ballatori N.](#) (1998b) ATP-dependent transport of reduced glutathione in yeast secretory vesicles. *Biochem J.* **334** : 723-729.
- [Reddy BS, Rivenson A, El-Bayoumy K, Upadhyaya P, Pittman B, Rao CV.](#) (1997) Chemoprevention of colon cancer by organoselenium compounds and impact of high- or low-fat diets. *J Natl Cancer Inst.* **89** : 506-512.
- [Reddy MM, Light MJ, Quinton PM.](#) (1999) Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature* **402** : 301-304.
- [Ren XQ, Furukawa T, Chen ZS, Okumura H, Aoki S, Sumizawa T, Tani A, Komatsu M, Mei XD, Akiyama S.](#) (2000) Functional comparison between YCF1 and MRP1 expressed in Sf21 insect cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **270** : 608-615.
- [Reyes CL, Chang G.](#) (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science* **308** : 1028-1031.

- [Rigaud JL, Mosser G, Lacapere JJ, Olofsson A, Levy D, Ranck JL.](#) (1997) Bio-Beads : an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J Struct Biol.* **118** : 226-235.
- [Ringpfeil F, Lebwohl MG, Christiano AM, Uitto J.](#) (2000) Pseudoxanthoma elasticum : mutations in the *MRP6* gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 6001-6006.
- [Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC.](#) (1989) Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245** : 1066-1073.
- [Riordan JR.](#) (2005) Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol.* **67** : 701-718.
- [Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, Carvajal E, Balzi E, Goffeau A.](#) (2001) The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3** : 207-214.
- [Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF.](#) (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem.* **272** : 10685-10694.
- [Rosenberg MF, Callaghan R, Modok S, Higgins CF, Ford RC.](#) (2005) Three-dimensional structure of P-glycoprotein : the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J Biol Chem.* **280** : 2857-2862.
- [Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, Riordan JR.](#) (2004) Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem.* **279** : 39051-39057.
- [Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF, Ford RC.](#) (2003) Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem.* **278** : 8294-8299.
- [Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP.](#) (2001a) The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem.* **276** : 16076-16082.
- [Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, Callaghan R, Schmidlin A, Wooding C, Linton KJ, Higgins CF.](#) (2001b) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.* **20** : 5615-5625.
- [Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC.](#) (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol.* **4** : 1207-1214.
- [Rosteck PR Jr, Reynolds PA, Hershberger CL.](#) (1991) Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. *Gene* **102** : 27-32.
- [Sagne C, Isambert MF, Henry JP, Gasnier B.](#) (1996) SDS-resistant aggregation of membrane proteins : application to the purification of the vesicular monoamine transporter. *Biochem J.* **316** : 825-831.
- [Sanchez-Fernandez R, Davies TG, Coleman JO, Rea PA.](#) (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem.* **276** : 30231-30244.
- [Sandholm M, Sipponen P.](#) (1973) Formation of unstable selenite-glutathione complexes *in vitro*. *Arch Biochem Biophys.* **155** : 120-124.

- [Sauna ZE, Ambudkar SV.](#) (2000) Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 2515-2520.
- [Sauna ZE, Ambudkar SV.](#) (2001) Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem.* **276** : 11653-11661.
- [Sauna ZE, Muller M, Peng XH, Ambudkar SV.](#) (2002) Importance of the conserved Walker B glutamate residues, 556 and 1201, for the completion of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein (ABCB1). *Biochemistry* **41** : 13989-14000.
- [Saurin W, Hofnung M, Dassa E.](#) (1999) Getting in or out : early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol.* **48** : 22-41.
- [Saurin W, Koster W, Dassa E.](#) (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases : characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol Microbiol.* **12** : 993-1004.
- [Schafer FQ, Buettner GR.](#) (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide /glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* **30** : 1191-1212.
- [Scheffel F, Demmer U, Warkentin E, Hulsmann A, Schneider E, Ermler U.](#) (2005) Structure of the ATPase subunit CysA of the putative sulfate ATP-binding cassette (ABC) transporter from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *FEBS Lett.* **579** : 2953-2958.
- [Schmees G, Stein A, Hunke S, Landmesser H, Schneider E.](#) (1999) Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur J Biochem.* **266** : 420-430.
- [Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB, Stubbs MT.](#) (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B : identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol.* **330** : 333-342.
- [Schneider E, Hunke S.](#) (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems : functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits /domains. *FEMS Microbiol Rev.* **22** : 1-20.
- [Schneider E, Wilken S, Schmid R.](#) (1994) Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein. *J Biol Chem.* **269** : 20456-20461.
- [Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J.](#) (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J.* **17** : 5529-5535.
- [Seigneuret M, Garnier-Suillerot A.](#) (2003) A structural model for the open conformation of the *mdr1* P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J Biol Chem.* **278** : 30115-30124.
- [Senior AE, al-Shawi MK, Urbatsch IL.](#) (1995) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **377** : 285-289.
- [Senior AE, Gadsby DC.](#) (1997) ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol.* **8** : 143-150.
- [Senior AE.](#) (1998) Catalytic mechanism of P-glycoprotein. *Acta Physiol Scand Suppl.* **643** : 213-218.
- [Shamberger RJ.](#) (1985) The genotoxicity of selenium. *Mutat Res.* **154** : 29-48.
- [Shani N, Watkins PA, Valle D.](#) (1995) *PXA1*, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 6012-6016.

- [Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V.](#) (1999) Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem.* **259** : 841-850.
- [Shapiro AB, Ling V.](#) (1997) Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem.* **250** : 130-137.
- [Shapiro AB, Ling V.](#) (1998) Stoichiometry of coupling of rhodamine 123 transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *Eur J Biochem.* **254** : 189-193.
- [Sharff AJ, Rodseth LE, Spurlino JC, Quioco FA.](#) (1992) Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* **31** : 10657-10663.
- [Sharma KG, Kaur R, Bachhawat AK.](#) (2003) The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast : an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. *Arch Microbiol.* **180** : 108-117.
- [Sharma KG, Mason DL, Liu G, Rea PA, Bachhawat AK, Michaelis S.](#) (2002) Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell* **1** : 391-400.
- [Shen HM, Yang CF, Ong CN.](#) (1999) Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Cancer* **81** : 820-828.
- [Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M.](#) (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* **68** : 850-858.
- [Shilling RA, Balakrishnan L, Shahi S, Venter H, van Veen HW.](#) (2003) A new dimer interface for an ABC transporter. *Int J Antimicrob Agents.* **22** : 200-204.
- [Shuman HA.](#) (1982) Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem.* **257** : 5455-5461.
- [Shyamala V, Baichwal V, Beall E, Ames GE.](#) (1991) Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem.* **266** : 18714-18719.
- [Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C.](#) (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 13207-13212.
- [Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, Hunt JF.](#) (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* **10** : 139-149.
- [Sonveaux N, Vigano C, Shapiro AB, Ling V, Ruyschaert JM.](#) (1999) Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem.* **274** : 17649-17654.
- [Soszynski M, Kaluzna A, Rychlik B, Sokal A, Bartosz G.](#) (1998) Radiation inactivation suggests that human multidrug resistance-associated protein 1 occurs as a dimer in the human erythrocyte membrane. *Arch Biochem Biophys.* **354** : 311-316.
- [Spallholz JE.](#) (2001) Selenium and the Prevention of Cancer. Part II : Mechanism for the Carcinostatic Activity of Se Compounds. *The Bulletin Of The Selenium-Tellurium Development Association* **Oct** : 1-12.
- [Speiser DM, Ames GE.](#) (1991) *Salmonella typhimurium* histidine periplasmic permease mutations that allow transport in the absence of histidine-binding proteins. *J Bacteriol.* **173** : 1444-1451.
- [Srikanth CV, Chakraborti AK, Bachhawat AK.](#) (2005) Acetaminophen toxicity and resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **151** : 99-111.

- [Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC.](#) (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269** : 847-850.
- [Sun H, Molday RS, Nathans J.](#) (1999) Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem.* **274** : 8269-8281.
- [Szczypka MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ.](#) (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem.* **269** : 22853-22857.
- [Taglicht D, Michaelis S.](#) (1998) *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol.* **292** : 130-162.
- [Tam R, Saier MH Jr.](#) (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev.* **57** : 320-346.
- [Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, Schuetz JD, Swoboda KJ, Ptacek LJ, Rosier M, Dean M, Allikmets R.](#) (2001) Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, *ABCC11* and *ABCC12*, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* **273** : 89-96.
- [Thibodeau PH, Brautigam CA, Machius M, Thomas PJ.](#) (2005) Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding. *Nat Struct Mol Biol.* **12** : 10-16.
- [Thomas PJ, Hunt JF.](#) (2001) A snapshot of Nature's favorite pump. *Nat Struct Biol.* **8** : 920-923.
- [Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J.](#) (1995) Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* **268** : 426-429.
- [Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.](#) (1997) The ClustalX windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25** : 4876-4882.
- [Tomblin G, Bartholomew LA, Tyndall GA, Gimi K, Urbatsch IL, Senior AE.](#) (2004) Properties of P-glycoprotein with mutations in the "catalytic carboxylate" glutamate residues. *J Biol Chem.* **279** : 46518-46526.
- [Uebel S, Kraas W, Kienle S, Wiesmuller KH, Jung G, Tampe R.](#) (1997) Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 8976-8981.
- [Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S, Amachi T.](#) (1999) Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 1268-1272.
- [Urbatsch IL, al-Shawi MK, Senior AE.](#) (1994) Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry* **33** : 7069-7076.
- [Urbatsch IL, Beaudet L, Carrier I, Gros P.](#) (1998) Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* **37** : 4592-4602.
- [Urbatsch IL, Julien M, Carrier I, Rousseau ME, Cayrol R, Gros P.](#) (2000) Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein. *Biochemistry* **39** : 14138-14149.
- [Urbatsch IL, Sankaran B, Bhagat S, Senior AE.](#) (1995a) Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active. *J Biol Chem.* **270** : 26956-26961.
- [Urbatsch IL, Sankaran B, Weber J, Senior AE.](#) (1995b) P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J Biol Chem.* **270** : 19383-19390.

- [van Bakel H, Strengman E, Wijmenga C, Holstege FC.](#) (2005) Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. *Physiol Genomics* **22** : 356-367.
- [van der Heide T, Poolman B.](#) (2000) Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 7102-7106.
- [van Veen HW, Margolles A, Muller M, Higgins CF, Konings WN.](#) (2000) The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.* **19** : 2503-2514.
- [van Veen HW, Venema K, Bolhuis H, Oussenko I, Kok J, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN.](#) (1996) Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 10668-10672.
- [Velarde G, Ford RC, Rosenberg MF, Powis SJ.](#) (2001) Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single Particle image analysis. *J Biol Chem.* **276** : 46054-46063.
- [Verdon G, Albers SV, Dijkstra BW, Driessen AJ, Thunnissen AM.](#) (2003a) Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus* : nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J Mol Biol.* **330** : 343-358.
- [Verdon G, Albers SV, van Oosterwijk N, Dijkstra BW, Driessen AJ, Thunnissen AM.](#) (2003b) Formation of the productive ATP-Mg²⁺-bound dimer of GlcV, an ABC-ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol.* **334** : 255-267.
- [Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC.](#) (2003) On the mechanism of MgATP-dependent gating of CFTR Cl⁻ channels. *J Gen Physiol.* **121** : 17-36.
- [Vigano C, Margolles A, van Veen HW, Konings WN, Ruyschaert JM.](#) (2000) Secondary and tertiary structure changes of reconstituted LmrA induced by nucleotide binding or hydrolysis. A fourier transform attenuated total reflection infrared spectroscopy and tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem.* **275** : 10962-10967.
- [Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P.](#) (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10** : 1793-1808.
- [Wada S, Niimi M, Niimi K, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD, Uehara Y.](#) (2002) *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. *J Biol Chem.* **277** : 46809-46821.
- [Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ.](#) (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1** : 945-951.
- [Walter C, Wilken S, Schneider E.](#) (1992) Characterization of site-directed mutations in conserved domains of MalK, a bacterial member of the ATP-binding cassette (ABC) family. *FEBS Lett.* **303** : 41-44.
- [Wang K, Fruh K, Peterson PA, Yang Y.](#) (1994) Nucleotide binding of the C-terminal domains of the major histocompatibility complex-encoded transporter expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *FEBS Lett.* **350** : 337-341.
- [Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M.](#) (2000) Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* **103** : 169-179.
- [Wang W, Li G, Clancy JP, Kirk KL.](#) (2005) Activating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels with pore blocker analogs. *J Biol Chem.* **280** : 23622-23630.

- [Watanabe S, Kita A, Miki K.](#) (2005) Crystal Structure of Atypical Cytoplasmic ABC-ATPase SufC from *Thermus thermophilus* HB8. *J Mol Biol.* **353** : 1043-1054
- [Welsh MJ, Smith AE.](#) (1995) Cystic fibrosis. *Sci Am.* **273** : 52-59.
- [Wemmie JA, Moye-Rowley WS.](#) (1997) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-binding cassette transporter protein Ycf1p. *Mol Microbiol.* **25** : 683-694.
- [Wemmie JA, Szczypka MS, Thiele DJ, Moye-Rowley WS.](#) (1994) Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J Biol Chem.* **269** : 32592-32597.
- [Wu P, Oleschuk CJ, Mao Q, Keller BO, Deeley RG, Cole SP.](#) (2005) Analysis of Human Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1) by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization /Time of Flight Mass Spectrometry : Toward Identification of Leukotriene C₄ Binding Sites. *Mol Pharmacol.* **68** : 1455-1465.
- [Yan L, Spallholz JE.](#) (1993) Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochem Pharmacol.* **45** : 429-437.
- [Yan L, Yee JA, Boylan LM, Spallholz JE.](#) (1991) Effect of selenium compounds and thiols on human mammary tumor cells. *Biol Trace Elem Res.* **30** : 145-162.
- [Yang R, Cui L, Hou YX, Riordan JR, Chang XB.](#) (2003) ATP binding to the first nucleotide binding domain of multidrug resistance-associated protein plays a regulatory role at low nucleotide concentration, whereas ATP hydrolysis at the second plays a dominant role in ATP-dependent leukotriene C₄ transport. *J Biol Chem.* **278** : 30764-30771.
- [Yang R, McBride A, Hou YX, Goldberg A, Chang XB.](#) (2005) Nucleotide dissociation from NBD1 promotes solute transport by MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1668** : 248-261.
- [Yoshida M, Amano T.](#) (1995) A common topology of proteins catalyzing ATP-triggered reactions. *FEBS Lett.* **359** : 1-5.
- [Yuan YR, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas PJ, Hunt JF.](#) (2001) The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem.* **276** : 32313-32321.
- [Yuan YR, Martsinkevich O, Hunt JF.](#) (2003) Structural characterization of an MJ1267 ATP-binding cassette crystal with a complex pattern of twinning caused by promiscuous fiber packing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **59** : 225-238.
- [Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB, Schmitt L.](#) (2005) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J.* **24** : 1901-1910.
- [Zhang X, Cui Z, Miyakawa T, Moye-Rowley WS.](#) (2001) Cross-talk between transcriptional regulators of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **276** : 8812-8819.
- [Zhao Q, Chang XB.](#) (2004) Mutation of the aromatic amino acid interacting with adenine moiety of ATP to a polar residue alters the properties of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem.* **279** : 48505-48512.