DEVELOPPEMENT D'APPROCHES PREDICTIVES POUR L'INGENIERIE DES PROTEINES PAR EVOLUTION DIRIGEE ET APPLICATION AU DEVELOPPEMENT D'UNE THERAPIE ANTICANCEREUSE

Laetitia Jezequel

▶ **To cite this version:**

Laetitia Jezequel. DEVELOPPEMENT D'APPROCHES PREDICTIVES POUR L'INGENIERIE DES PROTEINES PAR EVOLUTION DIRIGEE ET APPLICATION AU DEVELOPPEMENT D'UNE THERAPIE ANTICANCEREUSE. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT : 2009PA112260 . tel-00565354

HAL Id: tel-00565354

https://theses.hal.science/tel-00565354

Submitted on 11 Feb 2011

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES

ANNÉE 2009 SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de docteur de l'Université PARIS-SUD 11

par Melle Laetitia JEZEQUEL

DEVELOPPEMENT D'APPROCHES PREDICTIVES POUR L'INGENIERIE DES PROTEINES PAR EVOLUTION DIRIGEE ET APPLICATION AU DEVELOPPEMENT D'UNE THERAPIE ANTICANCEREUSE

soutenue le 9 octobre 2009

COMPOSITION DU JURY :

Rapporteurs :	Pr. Laurent CORCOS Pr. Michel DION
Examinateurs :	Pr. Jean-Pierre MAHY Pr. Marie-Agnès SARI
Directeurs de thèse :	Dr. Denis POMPON Dr. Jacqueline LOEPER

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.
Man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE
„Italienreise“ (1787)

Remerciements

Je remercie d'abord Denis Pompon de m'avoir accueillie puis encadrée pendant ces 5 (!) années passées au laboratoire. Votre fourmillement d'idées m'a très souvent permis de sortir de certaines ornières. Merci aussi pour votre disponibilité et votre soutien en fin de thèse, période toujours difficile, et pour vos corrections rapides lors de la rédaction de ce manuscrit. Les remarques pertinentes sur mon travail me seront également très utiles pour la suite de ma vie professionnelle.
De même, merci à Jacqueline Loeper de m'avoir suivie et supportée quasi quotidiennement au cours de cette thèse. Merci pour ton indéfectible soutien, pour ton aide durant les manips, pour nos LONGUES discussions sur les tournures de phrase de mes diverses rédactions, présentations et autres posters (et sur beaucoup d'autres sujets aussi). Dans la même veine, merci d'avoir débroussaillé ce manuscrit, sans quoi il comporterait aujourd'hui 500 pages ! Merci enfin de m'avoir gâtée pourrie de bijoux, de chocolats et de biscuits qui m'ont permis de tenir au cours de ces années...
Un grand merci à mes rapporteurs de thèse, MM. les Dr. Laurent Corcos et Pr. Michel Dion, d'avoir accepté de porter un jugement sur ce manuscrit et sur la thèse en général, ceci malgré les changements de date qui ont placé la soutenance lors d'une période particulièrement chargée.
Merci au Pr. Marie-Agnès Sari d'avoir examiné ce travail et d'avoir apporté un regard supplémentaire à l'évaluation de ce travail.
Merci au Pr. Jean-Pierre Mahy d'avoir présidé mon jury de thèse et d'avoir ajouté son point de vue de chimiste, surtout au dernier moment.

Je remercie Gilles Truan pour avoir répondu (presque) inlassablement à toutes mes questions, pour son aide au quotidien dans les tâches même les plus administratives et rébarbatives, pour sa bonne humeur et pour sa capacité à supporter stoïquement une bande de filles ricanantes (parfois à ses dépends !).
Merci également à Philippe Urban, sans qui les dernières manips essentielles de la thèse n'auraient peut être pas existé. Merci aussi beaucoup pour les fous rires lors d'un congrès outre-Atlantique.
Un grand merci à Eric Guittet et Carine Van Heijenoort qui ont supporté sans broncher ma quasi-constante présence dans leur cafèt et dans leurs divers bureaux durant toutes ces années. Merci d'avoir eu la gentillesse de ne pas m'avoir fait payer de loyer !
Pour l'accueil offert lors de mon court séjour au pays merveilleux de *C.elegans*, je tenais enfin à remercier Renaud Legouis et toute son équipe.

Ma thèse aurait sans doute été beaucoup plus triste sans mes deux superbes "co-bureau". Par ordre chronologique et d'âge, muchas gracias a mi pequeñita Marcela (qui est environ toute l'étendue de mon espagnol). Merci pour ton chaleureux accueil de la "petite nouvelle", ton aide précieuse pour mes premiers pas à la paillasse, pour les moments de joie - mais aussi de tristesse - partagés, pour ton canapé parisien et pour mon souvenir d'un certain Bal des Pompiers du 14 juillet.
En second mais loin d'être secondaire, un très grand merci à toi Louise. Merci pour ta gentillesse, toutes ces discussions philosophico-comico-judéo-germano-modesques, pour ton soutien lors de la phase de rédaction, pour les vidéos matées ensemble et qui nous ont fait bien sourire, pour notre petite escapade slave, pour m'avoir fait découvrir plein de saveurs lointaines ainsi que les meilleures adresses de Paris et Berlin. Un smack2lou sur mon téléphone était toujours annonciateur d'un bon fou rire. Wesh grosse, t'es vraiment la meilleure !

Quand je suis arrivée au bâtiment 23B, il y avait déjà sur place un groupe de joyeux drilles, aujourd'hui communément appelés "Les Anciens" (ce qui ne veut strictement rien dire, mais bon !) qui m'ont permis d'appréhender mes premières années de la meilleure façon qui soit.
Un premier big up à Benoît, mon vieux rat préféré. Grâce à ton anniversaire, j'ai commencé le cycle infernal des pots le jour de mon arrivée au labo, ce qui m'a donné l'occasion de trouver tout plein de personnes avec qui discuter ! A côté de ça, je voudrais te remercier pour ta gentillesse frisant l'extrême, ton sourire, ton petit côté timide, tes goûts musicaux et gastronomiques de qualité qui m'ont permis de partager avec toi des concerts et des dîners dont je me rappellerai longtemps, et enfin pour tes compétences de guide touristique au Danemark !
Damjana, ma co-thésarde, un grand merci pour toutes ces discussions, parfois un peu futiles sans doute mais qui sont toujours agréables, pour tes invitations de dernière minute où je suis toujours traitée comme une reine, pour ton hospitalité et tes cadeaux, pour m'avoir permis de savoir situer la Slovénie sur une carte (et même d'y aller), et pour toutes les fois où tu m'as remonté le moral. Heureusement que tu étais là pour qu'on puisse se serrer les coudes ! Hvala lepa!
Comme suite logique, Cube a.k.a. Nicolas alias Bobby, merci de m'avoir fait vivre quelques-unes des plus grandes déconnades de toute ma vie, d'avoir eu comme moi le matin comme grand ennemi, ce qui me permettait d'être toujours en bonne compagnie le soir. Merci aussi pour ton cœur sur la main, de m'avoir fait découvrir qu'on peut jouer autre chose que Jeux Interdits à la guitare acoustique et que même les garçons peuvent être de vraies pipelettes !

Pierre, merci avant tout pour ton brownie de la mort qui a fait fondre tout le monde au labo ! Merci pour ces aventures campagnardes à l'accrobranche et au paintball, ces trajets toujours plus sympas en RER quand tu étais là, ton côté boute-en-train quand tu es bourré et enfin pour ta maîtrise des logiciels vidéo qui m'a valu un magnifique cadeau de soutenance que je regarderai toujours avec plaisir.
Merci à "l'entité" Pascale et Matthieu pour m'avoir toujours accueilli à bras ouverts chez vous, pour être restés jeunes dans votre tête, pour les rires partagés, pour votre soutien tout au long de cette thèse et pour toutes vos sauces Sacla !!
Olivier, merci pour toutes les conversations philosophiques sur le travail du chercheur, ta résilience psychologique permettant de lâcher du lest, ton ouverture d'esprit et même tes blagues les plus lourdingues !

Un merci plus collectif pour toutes les autres personnes qui ont rendu ce séjour au laboratoire très agréable : Edith pour les paris débiles et donc les michokos, Florence pour ton accent chantant et tes pics de folie sur IAM, Aude pour avoir toujours été de bon conseil sur des sujets qui me tenaient à cœur et pour ta joie de vivre, Muriel pour toutes tes résolutions de problèmes possibles et imaginables, Christina pour ton point de vue incisif et tes blagues, Stéphane pour m'avoir embarqué dans tes élucubrations très drôles, Aurélien pour tes explications toujours claires et ton humour, Christine pour ton soutien très apprécié en début de thèse, Jean-Marie d'être aussi déjanté, Nicolas pour m'avoir permis de comprendre l'informatique en s'amusant, Cyril et ses connes, Sandrine, Clotilde, Jean-Louis, Alda, Vanessa, Sophie, FX, Eric Jacquet, Annie, Naïma, Ewen, Laure, Geneviève et les autres !

De façon non professionnelle, de nombreuses personnes m'ont également permis de ne pas me transformer en rate de laboratoire et pour ça je les remercie.
SeB, ça fait depuis ma première année d'étude que tu es là pour moi et que tu m'offres ton soutien dans tous les domaines. 11 ans après j'étais toujours étudiante et tu étais toujours là ! Je tenais à te remercier pour tous les très bons moments et les galères traversés ensemble, un grand merci de m'avoir accompagné pour les étapes importantes de mon parcours. Keep on being yourself, Mariah te dit à dans 10 ans.
Karima, merci de ta continuelle gentillesse et de ton intérêt constant pour ce que je faisais au labo. Ca fait plaisir de voir qu'il reste encore des gens qui pensent que la recherche sert à quelque chose ! Merci aussi pour les récits d'hôpital ou d'ailleurs qui m'ont fait plusieurs fois pleurer de rire et sortir la tête de la thèse.
FaB, merci d'avoir supporté une cohabitation presque permanente avec moi et de m'avoir fait découvrir un monde très différent du mien. Je suis heureuse que tu fasses maintenant partie de mon paysage amical et j'apprécie toujours tes blagues sur mon travail !!

Un merci chaleureux à ces non-chercheurs qui étaient présents le jour de ma soutenance : Aurore (spéciale dédicace pour la longévité de notre amitié), Nat, Laurence, Coralie et Stéphane. C'était particulièrement agréable de vous avoir à mes côtés !

Enfin un gigantesque merci à ma famille qui a été derrière moi pendant tout ce temps.
D'abord merci à mes parents de m'avoir soutenu et supporté inconditionnellement pendant la durée de la thèse, ça n'a pas été facile tous les jours! Cette journée de soutenance a été riche en émotions et j'ai été très heureuse que vous ayez été là pour les partager avec vous.
Merci à mon petit frère (à qui je dédicace l'exergue de ce pavé) et à ma petite sœur d'avoir suivi (et filmé !) toutes mes aventures et de m'avoir permis de faire baisser la pression de temps en temps grâce à quelques délires bien barrés.
Merci à la famille étendue, dont certains étaient présents le jour de la thèse, ça me fait plaisir de voir que vous avez tous essayé de comprendre ce que je faisais et où tout ça allait mener.

Et le dernier merci, le meilleur, est pour tous ceux que j'ai oubliés !

Table des matières

INTRODUCTION **1**

1. RELATIONS STRUCTURE – FONCTION AU SEIN DU P450 ..... **3**

1.1. LA SUPERFAMILLE DES CYTOCHROMES P450 5

1.1.1. Historique *5*

1.1.2. Les P450s, des enzymes hémo-thiolate *6*

1.1.2.1. Hème 6

1.1.2.2. Cycle catalytique 6

1.1.3. Diversité des P450s *8*

1.1.3.1. Multiplicité en gènes 8

1.1.3.2. Multiplicité de localisation 13

1.1.3.3. Multiplicité des partenaires redox 13

1.1.3.4. Multiplicité de fonction : réactions catalysées, substrats et rôles 14

1.1.4. Métabolisme des xénobiotiques : *16*

1.1.5. Evolution *18*

1.1.6. Expression hétérologue *18*

1.2. STRUCTURE DES P450S 22

1.2.1. Chronologie *22*

1.2.2. Structure primaire *24*

1.2.2.1. Elements conservés 24

1.2.2.2. Eléments variables : les Sites de Reconnaissance de Substrat (SRS) 25

1.2.3. Structure secondaire *27*

1.2.4. Structure tertiaire/Repliement *29*

1.2.4.1. Eléments variables 29

1.2.4.2. Eléments conservés 31

1.2.5. Co-cristallisation avec un ligand *31*

1.2.6. Modélisation moléculaire *33*

1.2.6.1. Construction de modèles structuraux par homologie et "amarrage" 33

1.2.6.2. Canaux d'accès 34

1.3. RELATIONS STRUCTURE – FONCTION 38

1.3.1. Présentation *38*

1.3.2. Mutagenèse dirigée *39*

1.3.2.1. P450s bactériens 39

1.3.2.2. P450s mammifères 40

1.3.3. Evolution dirigée *42*

1.3.3.1. Mutagenèse aléatoire 42

1.3.3.2. PCR sexuelle 43

1.3.4. Combinaison de méthodes ... *46*
1.4. RATIONALISATION DES APPROCHES D'ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE – FONCTION ... 47
1.4.1. Algorithmes de décision ... *47*
1.4.1.1. Mutagenesis Assistant Program (MAP) ... 47
1.4.1.2. SCHEMA ... 48
1.4.2. Utilisation d'approches statistiques multivariées ... *49*
1.4.2.1. Principe ... 49
1.4.2.2. Applications ... 50
1.4.3. Nouvelles méthodes de modélisation ... *52*
1.4.3.1. Blocs Structuraux Conservés ... 52
1.4.3.2. Protéines artificielles ... 53
1.4.4. Techniques de chimerogenèse semi-rationnelles ... *54*
1.4.4.1. Techniques historiques de chimérogenèse ... 54
1.4.4.2. Chimérogenèse de matrices possédant peu d'homologie ... 56
1.4.4.3. Chimères avec des points de jonction définis ... 56
2. THERAPIES ANTICANCEREUSES ... 61
2.1. INTRODUCTION ... 63
2.2. THERAPIES NON MEDICAMENTEUSES ... 63
2.3. CYTOTOXIQUES INDIRECTS ... 63
2.3.1. Antiangiogéniques ... *63*
2.3.2. Anticorps ... *64*
2.3.3. Thérapies hormonales ... *65*
2.4. ANTINEOPLASIQUES/CYTOTOXIQUES DIRECTS ... 65
2.4.1. Antibiotiques antitumoraux ... *65*
2.4.2. Antimétaboliques (analogue de bases/blocage voie de synthèse) ... *66*
2.4.3. Agents alkylants ... *67*
2.5. UTILISATION DES NANOPARTICULES ... 68
2.5.1. Diagnostic ... *68*
2.5.2. Imagerie ... *68*
2.5.3. Délivrance ... *69*
2.5.3.1. Circulation ... 69
2.5.3.2. Ciblage passif (Figure 34B) ... 69
2.5.3.3. Ciblage actif (Figure 34C et D) ... 71
2.5.4. Types de nanoparticules ... *72*
2.6. THERAPIE GENIQUE ... 73
2.6.1. Principe et exemples ... *73*
2.6.2. Vectorisation ... *73*
2.6.2.1. Virus ... 73
2.6.2.2. Méthodes non-virales ... 74

2.7. THERAPIE ENZYME-PRODROGUE 75
2.7.1. Introduction 75
2.7.2. Thérapie enzyme-prodrogue : application en cancérologie 76
2.7.3. GDEPT 78
2.7.4. Cyclophosphamide 81
2.7.4.1. Présentation 81
2.7.4.2. Pharmacocinétique 81
2.7.4.3. Métabolisme 82
2.7.5. CYP2B6 84
2.7.5.1. Généralités 84
2.7.5.2. Substrats 84
2.7.6. Utilisation du couple CYP2B/oxazaphosphorines pour une GDEPT 85
2.7.6.1. Présentation 85
2.7.6.2. Essais cliniques 86
2.7.6.3. Amélioration de la GDEPT CYP2B/CPA 86
2.8. GENOTOXICITE 93
2.8.1. Mécanismes généraux 93
2.8.2. Mécanismes de réparation et protéines impliquées 94
2.8.3. Réponse globale aux dommages à l'ADN 95
2.8.4. Tests de génotoxicité 96
2.8.5. Utilisation d'un gène rapporteur dans la levure 97
3. PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE 99
RESULTATS ET DISCUSSION 103
4. PARTIE 1 : METHODE DE CHIMEROGENESE 105
4.1. CONTEXTE 107
4.2. REALISATION 107
4.2.1. Méthode enzymatique 107
4.2.2. Méthode de "génération indépendante de la séquence d'une banque semi-ordonnée de chimères" ou SIGNAL (Sequence Independant Generation of a chimerA ordered Library) 108
4.2.3. Clonage des séquences chimériques 108
4.3. RESULTATS 109
4.3.1. Modélisation des CYPs 2B11 et 2B6 109
4.3.2. Dessin des modules structuraux du gène synthétique du CYP2B11 111
4.3.2.1. Découpage de la séquence du CYP2B11 111
4.3.2.2. Structure des modules 113
4.3.3. Génération des chimères 116
4.3.3.1. Méthode enzymatique 116
4.3.3.2. Application 117

4.3.3.3. Méthode SIGNAL : réalisation ... 118
4.3.3.4. Clonage indépendant de la ligation (LIC) de l'ADN des chimères dans pYeDP1-8-2 (pV8) ... 118
4.3.3.5. Application ... 119

ARTICLE ... 121

4.4. DISCUSSION ET CONCLUSION ... 123
4.4.1. Comparaison des méthodes de construction de chimères ... 123
4.4.2. Méthode SIGNAL : applications ... 124

5. PARTIE 2 :RELATIONS STRUCTURE-FONCTION : CYP2B11, CYP2B6 ET CHIMERES ... 125

5.1. CONTEXTE ... 127
5.2. REALISATION ... 127
5.3. RESULTATS ... 130
5.3.1. Correction des données ... 130
5.3.2. Calcul d'erreur sur les constantes enzymatiques ... 130
5.3.3. Considérations sur le K_m ... 133
5.3.4. Comparaison des constantes enzymatiques ... 136
5.3.4.1. Constante de Michaëlis des enzymes vis-à-vis de la CPA : K_m^C ... 136
5.3.4.2. Constante catalytique de l'activité CPA hydroxylase des enzymes : k_2^C ... 136
5.3.4.3. Efficacité catalytique pour l'activité CPA hydroxylase des enzymes : k_2^C/K_m^C ... 138
5.3.4.4. Constante de Michaëlis des enzymes vis-à-vis de l'EFC : K_m^E ... 138
5.3.4.5. Expression dans la levure ... 140
5.3.4.6. Perte de fonctionnalité ... 140
5.4. DISCUSSION ... 141
5.4.1. Canaux du CYP2B6 ... 141
5.4.2. Topologie membranaire des CYPs 2B11 et 2B6 ... 141
5.4.3. Relations entre K_m et structure tridimensionnelle ... 144
*5.4.4. Chimères présentant un K_m^C proche de celui du CYP2B11 : **A, E, F, J, K, N et O** ... 145*
5.4.4.1. Chimères présentant une efficacité catalytique proche de celle du CYP2B11 : **A, F, J, K, N et O** ... 145
5.4.4.2. Chimère présentant un TN inférieur à celui du CYP2B11 : **E** ... 146
*5.4.5. Chimères présentant un K_m^C intermédiaire : **B, H, M et G** ... 148*
5.4.5.1. Chimère B ... 148
5.4.5.2. Chimère H ... 151
5.4.5.3. Chimère M ... 153
5.4.5.4. Chimère G ... 155
*5.4.6. Chimères inactives : **D, I et L** ... 157*
5.4.6.1. Chimère D ... 157
5.4.6.2. Chimère I ... 159
5.4.6.3. Chimère L ... 159
5.4.7. Analyse globale des chimères ... 160

5.4.7.1. Modification du K_m vis-à-vis de la CPA 160
5.4.7.2. Modification de la constante catalytique de l'activité CPA hydroxylase : k_2^C 161
5.4.7.3. Modification de l'efficacité catalytique des enzymes : rapport k_2^C/K_m^C 162
5.4.7.4. Affinités vis-à-vis de la CPA et de l'EFC 163
5.4.7.5. Inactivité des chimères D, I et L 163
5.5. CONCLUSIONS 164

6. PARTIE 3 : CYTOTOXICITE DE LA CPA ET SYSTEMES RAPPORTEURS 167

6.1. CONTEXTE 169
6.2. METHODOLOGIE 169
6.3. RESULTATS 170
6.3.1. Test en gouttes d'effet sur la croissance 170
6.3.2. Test de viabilité et aptitude à la respiration 170
6.3.3. Test de croissance en milieu liquide 171
6.3.4. Caractérisation de la bioconversion de la CPA et analyse par CLHP - SM 172
6.3.4.1. Caractérisation de la bioconversion de la CPA dans *S.cerevisiae* 172
6.3.4.2. Analyse de la cinétique des métabolites du CPA sur levures entières 175
6.3.5. Construction du plasmide rapporteur 175
6.3.6. Test du plasmide rapporteur 177
6.3.7. C. elegans : Utilisation de surnageant de levure 177
6.3.8. C.elegans : Utilisation du mafosfamide 178
6.4. DISCUSSION 180
6.4.1. Génotoxicité de la CPA chez S.cerevisiae W303 180
6.4.2. Systèmes rapporteurs pour l'évaluation de l'activité des variants chimériques de P450 181
6.4.2.1. S.cerevisiae 181
6.4.2.2. C.elegans 181
6.5. CONCLUSIONS 182

7. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 183

7.1. METHODE DE CHIMEROGENESE 185
7.2. RELATIONS STRUCTURE-FONCTION 186
7.3. GENE RAPPORTEUR/CRIBLE A HAUT DEBIT 188

ANNEXES 189

8. ANNEXE I : MATERIEL ET METHODES 191

8.1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET PLASMIDES 193
8.1.1. Souches 193
8.1.2. Plasmides 193
8.2. BIOLOGIE MOLECULAIRE 194
8.2.1. Méthode enzymatique de génération des chimères 194

8.2.2. Méthode SIGNAL de génération de chimères *195*
8.2.3. Clonage de l'ADN des chimères dans pYeDP1-8-2 (pV8) *195*
8.2.4. Transformation des levures *196*
8.2.5. Construction du plasmide contenant le gène rapporteur RAD54 ..... *197*
8.3. MESURE DE L'ACTIVITE 4-OH CPA HYDROXYLASE 198
8.3.1. Réalisation *198*
8.3.2. Analyse chromatographique *200*
8.3.2.1. Conditions analytiques 200
8.3.2.2. Pics et m/z détectés 200
8.4. EFFET DE LA CYCLOPHOSPHAMIDE (CPA) SUR S.CEREVISIAE 201
8.4.1. Test de croissance en gouttes *201*
8.4.2. Test de viabilité et aptitude à la respiration *202*
8.4.3. Test de croissance en milieu liquide *202*
8.4.4. Test du système rapporteur dans S.cerevisiae *202*
8.5. CAENORHABDITIS ELEGANS 203
8.5.1. Utilisation du surnageant de levure *203*
8.5.2. Utilisation du mafosfamide *204*
9. ANNEXE II : RESULTATS 205
BIBLIOGRAPHIE 215

Abréviations et acronymes

4-OH CPA	4-hydroxy cyclophosphamide
7-BC	7-butoxycoumarine
7-EC	7-ethoxycoumarine
7-EFC/7EFC	7-ethoxy–4-trifluoromethylcoumarine
ABC	ATP binding cassette
Ac	Anticorps
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADEPT	Thérapie enzyme-prodrogue dirigée par un anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP¨	Adenosine diphosphate
aFGF	Facteur de croissance fibroblastique acide
Ag	Antigène
AhR	Récepteur des hydrocarbures aromatiques
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ARN	Acide ribonucléotide
ARNm	ARN messager
Arnt	Translocateur nucléaire de l'AhR
ATP	Adenosine triphosphate
BAP	Benzo(a)pyrène
BER	Réparation par excision de base
bFGF	Facteur de croissance fibroblastique basique
CEA	Antigène carcinoembryonique
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CLERY	Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO	Monoxyde de carbone
CPA	Cyclophosphamide
CPI	4-(4-chlorophenyl) imidazole
CPR	Cytochrome P450 réductase
CSB	Blocs structuraux conservés
CYC1	Iso-1-cytochrome c
CYP	Cytochrome P450
DCM	Dichlorométhane
DNA	Desoxyribonucleic acid
EFC	7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarine
EPNP	1, 2-epoxy-3-(4-nitrophenoxy)propane
EPR	Effet d'augmentation de la perméabilité et de la rétention
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
FxR	Ferredoxine réductase
Fx	Ferredoxine
GCV	Ganciclovir
GDEPT	Thérapie génique enzyme-prodrogue
GFP	Green Fluorescent Protein
GGR	Réparation génomique globale

GPAT	Thérapie génétique d'activation de prodrogue
GST	Glutathion-S-transférases
HRR	Recombinaison homologue
HSV-tk	Thymidine kinase du virus herpes simplex
ICH	International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
IFA	Ifosfamide
IgG	Immunoglobuline G
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITCHY	Incremental truncation for the creation of hybrid
LEAPT	Thérapie enzyme-prodrogue dirigée par la lectine
LIC	Clonage indépendant de la ligation
MAP	Mutagenesis assistant program
MDS	Positionnement multidimensionnel
MeIQ	3,5-dimethylimidazole [4,5-f] quinoline
MMR	Réparation des mésappariements
NADH	Nicotinamide adenine dinucléotide, forme réduite
NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate, forme réduite
NER	Réparation par excision de nucléotide
NHEJ	Réparation par jonction d'extrémités
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
P450	Cytochrome P450
PAH	Hydrocarbures polycycliques aromatiques
PARP	Poly(ADP)-ribose polymérase
PCA	Analyse en composantes principales
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PDEPT	Thérapie enzyme-prodrogue dirigée par un polymère
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	Polyethylèneglycol
PELT	Thérapie liposome enzyme-polymère
PGK	3-phosphoglycerate kinase
PLGF	Facteur de croissance placentaire
ORF	Phase ouverte de lecture
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SeSaM	Sequence saturation mutagenesis
SHIPREC	Sequence homology-independent protein recombination
SIGNAL	Sequence independant generation of a chimera ordered library
SISDC	Sequence-independent site-directed chimeragenesis
SM	Spectrométrie de masse
SNP	Single nucleotide polymorphism
SRS	Site de reconnaissance du substrat
StEP	Staggered Extension Process
TCR	Réparation couplée à la transcription
TGF β -1	Facteur de croissance tumorale β-1
TN	Turnover
TTC	2, 3,5-triphenyl tetrazolium
UV	Rayons ultraviolets
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VDEPT	Thérapie enzyme-prodrogue dirigée par un virus
XRE	Elément de réponse aux xénobiotiques

Introduction

1. Relations structure – fonction au sein du P450

1.1. LA SUPERFAMILLE DES CYTOCHROMES P450 5

1.1.1. Historique *5*

1.1.2. Les P450s, des enzymes hémo-thiolate *6*

1.1.3. Diversité des P450s *8*

1.1.4. Métabolisme des xénobiotiques : *16*

1.1.5. Evolution *18*

1.1.6. Expression hétérologue *18*

1.2. STRUCTURE DES P450S 22

1.2.1. Chronologie *22*

1.2.2. Structure primaire *24*

1.2.3. Structure secondaire *27*

1.2.4. Structure tertiaire/Repliement *27*

1.2.5. Co-cristallisation avec un ligand *31*

1.2.6. Modélisation moléculaire *33*

1.3. RELATIONS STRUCTURE – FONCTION 38

1.3.1. Présentation *38*

1.3.2. Mutagenèse dirigée *39*

1.3.3. Evolution dirigée *42*

1.3.4. Combinaison de méthodes *46*

1.4. RATIONALISATION DES APPROCHES D'ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE – FONCTION 47

1.4.1. Algorithmes de décision *47*

1.4.2. Utilisation d'approches statistiques multivariées *49*

1.4.3. Nouvelles méthodes de modélisation *52*

1.4.4. Techniques de chimerogenèse semi-rationnelles *54*

1.1. La superfamille des cytochromes P450

1.1.1. Historique

Dès 1954, l'équipe de Brodie, et particulièrement Axelrod, observent que des microsomes de foie de rat et de lapin sont responsables de l'oxydation de nombreux médicaments (Cooper, Axelrod et al. 1954). De plus, ces réactions sont toutes inhibées par une seule molécule, le diethylaminoethyldiphenylpropylacétate HCl, ce qui laisse présager un mécanisme commun (Brodie, Axelrod et al. 1955). Parallèlement, une autre équipe met en évidence l'oxydation de stéroïdes par des extraits de glandes surrénales de bœuf (Ryan and Engel 1957), cette réaction étant inhibée par le monoxyde de carbone (CO). Peu de temps après, l'étude de fractions microsomales de foie de rat et de cochon révèle la présence d'un pigment présentant un spectre d'absorption original (Figure 1), avec un pic à 450 nm lorsque ce pigment sous forme réduite est mis en contact avec du CO (Garfinkel 1958; Klingenberg 1958). Logiquement, ce composé est alors nommé P (pour pigment) 450.

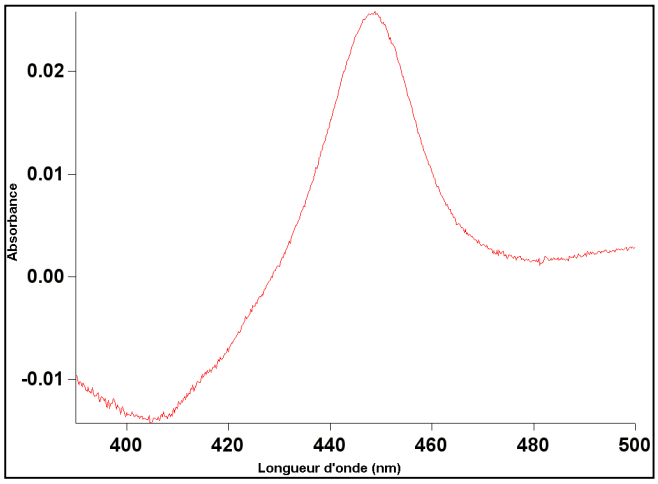


Figure 1. Spectre différentiel, en présence de monoxyde de carbone, de microsomes de levure surexprimant du CYP2B6.

Quelques années plus tard, Omura et Sato déterminent la nature hémoprotéique de ce pigment (Omura and Sato 1962 ; Omura and Sato 1964 ; Omura and Sato 1964) et le renomment alors cytochrome P450 (CYP ou P450). Ils effectuent également les premières caractérisations physico-chimiques du CYP (coefficient d'extinction molaire, propriétés spectrales). Cooper et Estabrook établissent en parallèle la fonction mono-oxygénase de cette métalloprotéine (Cooper, Estabrook et al. 1963 ; Estabrook, Cooper et al. 1963). Les premières purifications et reconstitutions des éléments constituant ce qui sera appelé plus tard le "système P450" (Katagiri, Ganguli et al. 1968 ; Lu and Coon 1968 ; Strobel, Lu et al. 1970; Estabrook, Baron et al. 1971, van der Hoeven, 1974), posent les bases d'une meilleure compréhension des propriétés catalytiques et du fonctionnement du P450.

1.1.2. Les P450s, des enzymes hémo-thiolate

1.1.2.1. Hème

La désignation “enzyme hémo-thiolate” des P450s prend en compte le fait que l’enzyme est constitué d’un groupement prosthétique de protoporphyrine IX (ou hème) (Figure 2) lié au groupement thiol d’une cystéine strictement conservée de l’apoprotéine (Dolphin, James et al. 1979). Cette dernière est constituée d’une chaine polypeptidique unique de poids moléculaire compris entre 45 et 60 kDa. Le plan de l’hème dans le P450 définit deux régions : la face **proximale,** située du côté du ligand cystéinate, et la face **distale** (Poulos, Finzel et al. 1985).

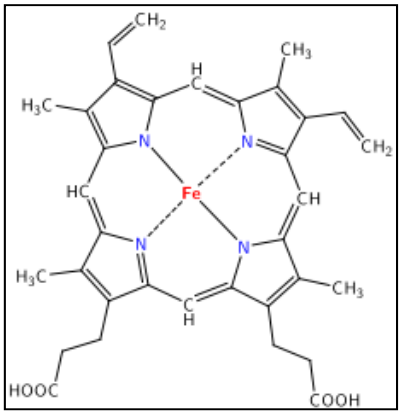


Figure 2. Protoporphyrine IX de fer ou hème

L’hème interagit avec la protéine par des interactions hydrophobes, des attractions électrostatiques et son ligand axial cystéinate-fer (White and Coon 1980) et il intervient dans les mécanismes de transformation de l’oxygène nécessaire à l’action du P450. La porphyrine occupe en effet une place importante dans les échanges électroniques du fer qui peut se trouver sous deux formes : “haut spin” (pentacoordonné) ou “bas spin” (hexacoordonné) (Mansuy, Battioni et al. 1989). Dans sa forme pentacoordonnée, le fer est lié aux quatre azotes de la porphyrine et à l’anion thiolate de son ligand axial. Le ligand supplémentaire faisant basculer le fer dans sa conformation hexacoordonnée est généralement l’oxygène d’une molécule d’eau (Sakurai and Yoshimura 1985) ou d’une chaîne latérale de l’apoprotéine. Cette liaison entre l’apoprotéine et l’hème confère au CYP ses propriétés spectrales particulières (White and Coon 1980).

1.1.2.2. Cycle catalytique

Les P450s font partie d’un complexe enzymatique qui, en présence de deux électrons et de deux protons, est capable d’insérer un atome d’oxygène (pour la plupart d’entre eux) dans un substrat (Mansuy, Battioni et al. 1989). Les deux électrons nécessaires à la réaction proviennent d’une molécule de NADH ou de NADPH *via* différents transporteurs d’électrons. La réaction générale catalysée par les CYPs peut s’écrire ainsi :

$$RH + O_2 + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$$

Le cycle catalytique de cette réaction (Figure 3) a été défini grâce à de nombreuses études mécanistiques et structurales réalisées sur le $P450_{cam}$ et certains de ses mutants bactériens (Schlichting, Berendzen et al. 2000; Davydov, Makris et al. 2001; Sligar, Makris et al. 2005).

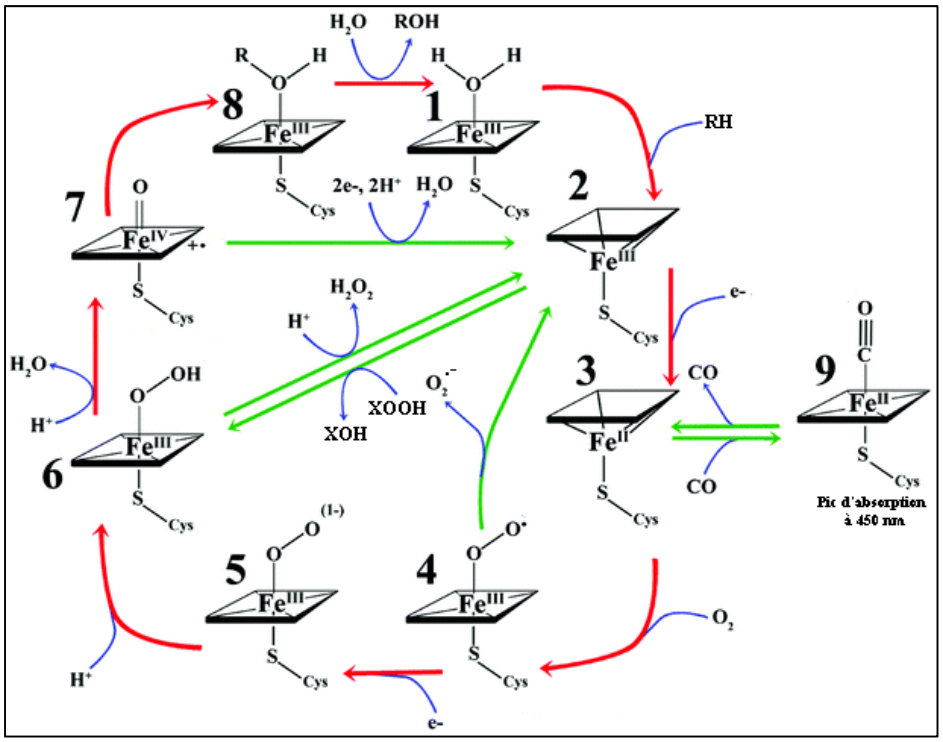


Figure 3. Schéma du cycle catalytique du P450. Représentation des changements ayant lieu au niveau de l'hème, RH représente le substrat.

(http://www.rsc.org/ej/CC/2008/b709121b/b709121b-s1.gif**)**

Voies productives (les numéros des complexes entre parenthèses font référence à la Figure 3): La première étape de fixation du substrat au niveau du site actif induit le changement de l'état de spin du complexe ferrique FeIII (2) par déplacement du sixième ligand initial de l'hème. La deuxième étape est le transfert d'un électron par le partenaire redox adéquat, ce qui réduit le complexe ferrique FeIII en complexe ferreux FeII (3). La fixation de CO sur ce complexe (3) permet l'observation du pic d'absorption caractéristique du complexe généré (9). Après fixation de l'oxygène moléculaire (4) sur le site de coordination vacant lors de la troisième étape, l'arrivée d'un deuxième électron réduit l'oxygène et génère le composé peroxyferrique (5) qui est ensuite protoné pour former le composé hydroperoxo (6).Un second proton déclenche la rupture hétérolytique de la liaison O-O, formant une molécule d'eau et l'entité fer-oxo (7), extrêmement réactif, qui transfère son atome d'oxygène au substrat (8). Le cycle se termine par la libération du substrat transformé et le retour du fer de l'hème à son état initial FeIII (1).

Dans certains cas, le P450 est capable de s'affranchir du transfert d'électrons en utilisant certains agents oxydants donneurs d'atome d'oxygène, tels que les peracides ou les hydroperoxydes (notés XOOH sur la Figure 3), pour les plus connus. Ces composés permettent à l'enzyme de passer directement de l'état initial (1) à l'entité hydroperoxo (6) dans le cadre de ce qui est nommé le cycle court du P450 (ou peroxide shunt) (White and Coon 1980).

Voies abortives : De façon théorique, le cycle catalytique du P450 est ce qu'on appelle couplé, c'est-à-dire qu'une seule molécule de NAD(P)H est nécessaire à la réalisation complète du cycle. C'est souvent le cas pour les P450 bactériens, dont le $P450_{cam}$, et pour les cytochromes intervenant dans les voies de biosynthèse, qui présentent une spécificité de substrat relativement étroite (Davydov 2001). Mais en ce qui concerne les CYPs eucaryotes du métabolisme des xénobiotiques, il arrive souvent que le cycle soit découplé et que l'utilisation d'une molécule de NAD(P)H n'aboutisse pas à la formation du métabolite attendu (Gruenke, Konopka et al. 1995). Ceci peut s'effectuer par décomposition du complexe (4), la rupture homolytique de la liaison O-O ou encore la réaction du complexe fer-oxo (7) avec deux électrons et deux protons. Toutes ces réactions conduisent à la formation d'une molécule d'H_2O, d'H_2O_2 ou d'O_2 et au retour du P450 à l'état (2).

Dans le cas des CYPs microsomaux, cette activité oxydase est souvent plus importante que l'activité catalytique oxygénase elle-même (Davydov 2001). En fait, le découplage dépend de nombreux paramètres influant sur la vitesse de transfert des électrons ou des protons, comme la présence de molécules d'eau ou un mauvais positionnement du substrat dans le site catalytique, ou encore une mauvaise interaction avec les partenaires redox (Sligar, Makris et al. 2005).

En résumé, le cytochrome P450 est un enzyme, comprenant un groupement prosthétique hème, et capable d'insérer un atome d'oxygène dans un substrat, via l'apport de deux électrons.

1.1.3. Diversité des P450s

1.1.3.1. Multiplicité en gènes

Lors de sa découverte, le P450 a d'abord été considéré comme un unique cytochrome (Coon 2005). Mais très vite, il a été observé que cet enzyme était capable de catalyser une grande variété de substrats, que la fixation de certains inhibiteurs était sélective et que la quantité de métabolite formé chez le rat pour certains composés différait selon l'âge ou le sexe (Lu, Levin et al. 1973). Ceci a conduit à formuler l'hypothèse que le P450 pouvait exister sous de multiples formes, issues en fait d'une multiplicité en gènes (Gonzalez, Skoda et al. 1988). Avec les progrès de la biologie moléculaire, des gènes de P450 ont été retrouvés de façon quasi-ubiquitaire dans les organismes vivants, à quelques exceptions près, telle *E. coli* (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000). Le nombre de P450s présents dans les différents organismes est répertorié sur le site http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html. A la date du 29 février 2008, pas moins de 8128 séquences de P450s provenant de bactéries, de mammifères, de plantes, d'insectes, de champignons et de protistes étaient répertoriées sur le site. C'est le séquençage systématique de nombreux génomes d'organismes modèles qui a permis la détection de nouvelles séquences de P450, dont un bon nombre sont d'ailleurs "orphelins" de fonction. Chez l'humain, 58 gènes et 57 pseudogènes ont ainsi été recensés.

1.1.3.1.1. Nomenclature

En 1987, devant le nombre croissant de nouveaux P450s découverts, une nomenclature a été définie (Nebert, Adesnik et al. 1987) afin d'homogénéiser la désignation de cette pléthore de gènes. Mise à jour à intervalles réguliers (Nebert, Nelson et al. 1989; Nebert, Nelson et al. 1991; Nelson, Kamataki et al. 1993; Nelson, Koymans et al. 1996; Nelson, Zeldin et al. 2004), cette nomenclature est aujourd'hui entièrement expliquée sur le site de D. Nelson.

En bref, le symbole CYP (ou Cyp chez la souris et la drosophile) est utilisé comme abréviation du terme cytochrome P450 pour désigner un ADNc, l'ARNm ou la protéine elle-même. En italique, *CYP/Cyp* fait référence au gène. Les lettres P ou ps placées à la fin du nom d'un gène indiquent sa nature pseudogénique. Au final, la variété de réactions effectuées et de substrats catalysés par les P450s étant tellement importante, il a été convenu que les enzymes soient classés en fonction de leur degré de similitude de séquence primaire. A la suite du symbole CYP, on trouve donc, dans l'ordre :

- un premier chiffre arabe désignant l'appartenance à une **famille**, regroupant les CYPs présentant plus de 40 % d'identité de séquence entre eux (CYP1, CYP2, …)
- une lettre majuscule désignant l'appartenance à une **sous-famille**, regroupant les CYPs présentant au moins 55% d'identité de séquence entre eux (CYP1A, CYP1B, …)
- enfin, un deuxième chiffre arabe désigne chaque **isoforme** d'une même sous-famille (CYP1A1, CYP1A2, …)

Si une seule isoforme est présente dans une sous-famille, il n'est pas nécessaire de mentionner le deuxième chiffre.

Ces seuils de classification (40 et 55%), définis aléatoirement, se sont révélés finalement assez informatifs et justes au niveau de la ségrégation des différentes familles et sous-familles, malgré quelques inexactitudes (Nebert, Nelson et al. 1991). Mais à nouveau, devant le nombre croissant de familles, un niveau de classification supplémentaire a fait son apparition : le clan. (Nelson 1999) Cette nomenclature est issue de l'observation du regroupement de certaines familles lors de la construction de nombreux arbres phylogénétiques. Chaque clan est désigné par un chiffre : soit le chiffre de la famille majoritairement représentée dans le clan, soit le chiffre correspondant à celui de la famille du clan présentant le plus petit chiffre.

1.1.3.1.2. Polymorphisme

Généralités : Une autre forme de variabilité génétique des P450s est représentée par des mutations alléliques qui, si l'allèle le plus rare est présent à une fréquence supérieure à 1% d'une population, sont nommées polymorphismes (Nelson 1999). Le type de polymorphisme le plus courant est la mutation d'une base du gène (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP), dans la phase codante ou au niveau des parties régulatrices. Mais il existe également des phénomènes de délétions ou d'insertions de petites séquences voire même un changement

du nombre de copies du gène (Meyer and Zanger 1997). La nomenclature mise au point pour désigner ces variants chez l'humain est détaillée sur le site http://www.cypalleles.ki.se/. Une partie de ces polymorphismes entraînent des variations de phénotype (Nebert and Dieter 2000), présentant généralement une variation interethnique de leur fréquence d'apparition et une distribution bi- ou trimodale des individus en métaboliseurs lents, rapides et parfois intermédiaires

Ceci a été étudié de façon extensive depuis l'observation de grandes disparités au niveau du métabolisme d'un médicament antihypertenseur, la débrisoquine, par le CYP2D6 (Gonzalez, Skoda et al. 1988). Pour le CYP2D6 par exemple, 5 à 10% de la population caucasienne présente un phénotype métaboliseur lent, ce qui est une proportion plus élevée que dans la population asiatique (Lewis, Watson et al. 1998) et 5,5% de la population européenne possède un phénotype de métaboliseur rapide (Ingelman-Sundberg 2004). Selon que le P450 concerné est responsable de l'élimination ou de l'activation d'un médicament, le phénotype métaboliseur lent ou rapide peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'effet pharmacologique de la molécule.

De façon plus épisodique, certains polymorphismes ont également pu être corrélés à une susceptibilité accrue à certains cancers (Harris 1989 ; Singh, Parmar et al. 2008), comme par exemple dans le cas du CYP1A1 et du cancer du sein (Laden, Ishibe et al. 2002 ; Li, Millikan et al. 2005). Mais ces résultats sont parfois contestés, invoquant l'interférence des facteurs environnementaux dans les études cliniques (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006).

En ce qui concerne les CYPs impliqués dans les voies de biosynthèse, certains polymorphismes peuvent être associés à des syndromes sévères voire létaux de déplétion en certains composés ou d'accumulation de précurseurs toxiques. L'hyperplasie congénitale des surrénales, par exemple, atteint des nourrissons possédant une mutation sur le gène du CYP21A2. Ces patients présentent une déficience de la synthèse du cortisol et parfois de l'aldostérone conduisant à des syndromes d'hypervirilisation ou des risques létaux de déséquilibre de l'homéostasie sodique rénale (Higashi, Hiromasa et al. 1991; White and Speiser 2000; Stikkelbroeck, Hoefsloot et al. 2003). Une autre pathologie, la xanthomatose cérébrotendineuse, est due à une mutation sur le gène de la 27-hydroxylase ou CYP27A1 impliqué dans la synthèse des acides biliaires (Cali, Hsieh et al. 1991; Cali and Russell 1991). Ceci induit une accumulation de cholestérol et de cholestanol, entre autres dans le cerveau et les yeux, responsables de troubles psychiatriques et de cataracte à la puberté.

En conséquence, l'étude de la pharmacogénomique s'est développée, conduisant entre autres à un génotypage systématique des patients, avant l'administration de certains médicaments ou pour évaluer la probabilité qu'ils développent certaines pathologies (Evans and Relling 1999).

Exemple du CYP2B6 : Plusieurs formes polymorphiques du CYP2B6 humain, auquel nous nous intéressons particulièrement, ont été détectées à ce jour (Zhao and Halpert 2007). Bien qu'exprimé à taux relativement faible dans le foie, le CYP2B6 humain est impliqué dans le métabolisme d'environ 8% des médicaments mis sur le marché (Nolan, Phillips et al. 2006). La signification clinique du polymorphisme génétique du CYP2B6 a été mise en évidence à partir d'un nombre croissant d'analyses corrélées. Les mutations détectées chez les variants du CYP2B6 sont apparemment localisées hors du site actif (Figure 4A).

Diverses études *in vitro* ou *in vivo* menées sur ces variants ont révélé l'influence de certains polymorphismes dans le métabolisme du bupropion (Kirchheiner, Klein et al. 2003), de l'efavirenz (Wang, Sonnerborg et al. 2006), de la 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarine (Jinno, Tanaka-Kagawa et al. 2003 ; Iwasaki, Yoshimura et al. 2004). Certaines études ont également mis en évidence une baisse d'expression de certains variants dans divers systèmes hétérologues (Jinno, Tanaka-Kagawa et al. 2003; Wang, Sonnerborg et al. 2006).

La mutation K262R a été observée dans de nombreux variants du CYP2B6 présentant des altérations fonctionnelles et l'étude approfondie du mutant CYP2B6.4 correspondant a effectivement révélé une différence du métabolisme *in vitro* de plusieurs substrats et de la réponse à des inhibiteurs par rapport à la forme sauvage (Bumpus, Sridar et al. 2005). Une seule étude a montré qu'une importante activité cyclophosphamide 4-hydroxylase était corrélée avec la présence du CYP2B6.6 (Xie, Yasar et al. 2003). Certains variants "nuls" du CYP2B6 ont également été détectés (Lang, Klein et al. 2004) correspondant à une absence de protéine lors de l'expression hétérologue. Ceci prouve toute la diversité interindividuelle des réactions possibles à des médicaments divers et les risques y étant associés. En fait, en termes de fréquence d'allèles mutants, le CYP2B6 apparaît comme étant un des P450s humains les plus polymorphiques. Il a été démontré lors d'une étude que seul 22,3% de la population caucasienne était homozygote pour la forme sauvage du CYP2B6 (Lang, Klein et al. 2001). En comparaison, environ 15% des Caucasiens ont été détectés comme homozygotes pour la forme sauvage du CYP2D6 qui est probablement le P450 le plus polymorphique (Sachse, Brockmoller et al. 1997 ; Cascorbi 2003)

En conclusion, la superfamille des CYPs contient un très grand nombre de gènes ainsi qu'un certain nombre de variants et de pseudogènes, dans la quasi-totalité des organismes vivants. La variabilité des séquences primaires est telle que certains P450s peuvent ne présenter parfois qu'une identité de séquence très faible (jusqu'à 16%) (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000).

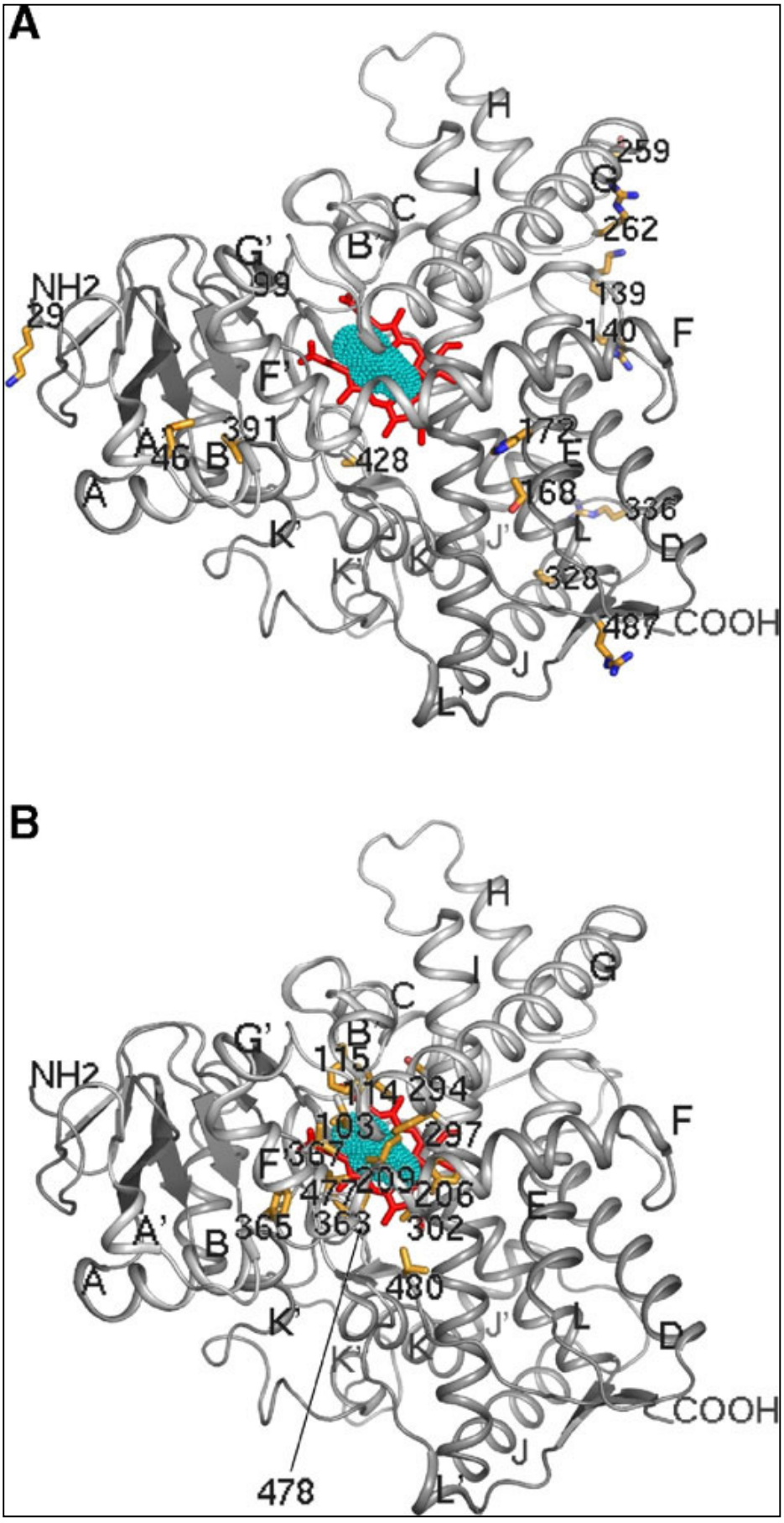


Figure 4. Les résidus mutés des variants polymorphiques du CYP2B6 (A) et les résidus démontrés comme étant importants pour le métabolisme du substrat par des études de mutagenèse des CYP2B (B) sont indiqués et représentés en bâtonnets sur la structure cristalline du CYP2B4 complexée avec le 4-(4-chloro phenyl)imidazole (4CPI). Les parties N- et C-terminales ainsi que le nom des hélices principales sont indiquées. L'hème et le 4CPI sont représentés sous forme de bâtonnets rouges et de points cyan, respectivement (Zhao and Halpert 2007).

1.1.3.2. Multiplicité de localisation

Chez les procaryotes, les CYPs sont cytosoliques (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000). Chez les plantes, certains CYPs peuvent être plastidiens (Schuler and Werck-Reichhart 2003). Pour les eucaryotes en général, les P450s sont principalement situés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et de la membrane interne de la mitochondrie (Niranjan, Raza et al. 1988). Les CYPs microsomaux sont synthétisés avec une séquence leader de 35 à 40 acides aminés. Cette séquence cible la protéine à la membrane du réticulum endoplasmique où la translocation est arrêtée par un signal d'arrêt de transfert composé d'un cluster de résidus basiques, positionnant le domaine catalytique dans le cytosol (Sakaguchi, Mihara et al. 1987). En plus d'un peptide signal amino-terminal clivable, les enzymes mitochondriales possèdent deux charges positives, généralement des arginines, proches du C-terminal. Ces deux résidus sont aussi retrouvés chez certains P450s bactériens et sont impliqués dans l'interaction de ces P450s avec leur partenaire redox commun, une ferrédoxine (Pochapsky, Lyons et al. 1996 ; Roitberg, Holden et al. 1998). Des CYPs ont également été détectés au niveau de la membrane plasmique (Loeper, Louerat-Oriou et al. 1998).

Dans l'organisme humain, au niveau du foie, les cytochromes P450 de mammifères impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques sont majoritairement ancrés par leur extrémité N-terminale au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique des hépatocytes, leur extrémité C-terminale se trouvant à la face cytoplasmique (van der Hoeven and Coon 1974). Mais d'autres organes tels que le cerveau, les poumons, les intestins, les glandes surrénales ou encore les reins contiennent également des CYPs (Ding and Kaminsky 2003).

1.1.3.3. Multiplicité des partenaires redox

Les électrons nécessaires à la catalyse du P450 proviennent du NAD(P)H et sont acheminés de cette molécule au site actif par différents types de transporteurs. Ceci a donné lieu à une classification des P450s en fonction du type de partenaires redox qui leur sont associé. Cette classification, comprenant initialement quatre classes (Paine, Scrutton et al. 2005), a été étendue à dix classes récemment (Hannemann, Bichet et al. 2007) afin de départager certains regroupements hébergeant des cas particuliers. Néanmoins, je ne détaillerai ici que la classification à quatre classes. Dans celle-ci, deux classes sur les quatre sont majoritairement représentées (classes I et II) (Figure 5).

La classe I contient les P450s ayant besoin de deux protéines de transport d'électrons pour leur fonctionnement, une ferredoxine réductase à flavine prélevant les électrons du NAD(P)H puis les transmettant à une ferredoxine à centre fer-soufre qui à son tour les transmet au CYP. Cette classe comprend la majorité des P450 bactériens et mitochondriaux.

La classe II est la plus communément représentée chez les P450s microsomaux. Elle comprend les P450s couplés à une seule protéine de transfert d'électrons, la cytochrome P450 réductase (CPR), une flavoenzyme comprenant deux domaines flaviniques FAD et FMN. De plus, cette classe englobe également un système non spécifique des P450s, faisant intervenir le cytochrome b5. Celui-ci est capable de transférer des électrons au P450, qu'il a reçu de la CPR ou de la NADH-cytochrome b5 réductase, flavoenzyme à FAD (Zhang, Im et al. 2007). Toutes ces protéines sont ancrées dans la membrane plasmique du réticulum endoplasmique. Le $P450_{BM3}$ de *Bacillus megaterium* soluble fait également partie de cette classe. Il est en effet composé de deux parties : un domaine homologue à la CPR et un domaine P450 (Narhi and Fulco 1987).

La classe III comprend les P450 autosuffisants, catalysant des isomérisations ou des déshydratations et qui ne requièrent pas d'oxygène moléculaire ou de source d'électrons. Les substrats que ces enzymes métabolisent sont généralement eux-mêmes riches en électrons tels que des hydroperoxydes ou des endoperoxydes. Le $P450_{PGIS}$ ou CYP8A1 humain, une prostacycline synthase, catalysant l'isomérisation de la prostaglandine en prostacycline, fait partie de cette classe (Hecker and Ullrich 1989; Chiang, Yeh et al. 2006).

La classe IV est composée d'un P450 unique de champignon, le $P450_{nor}$, recevant ses électrons directement du NADH pour catalyser la réduction du NO en N_20.

La nouvelle classification à dix classes, toujours basée sur les transferts d'électrons, a été proposée récemment afin de pallier à des regroupements paraissant peu appropriés pour certains P450s, bactériens surtout. Ces derniers ont été extraits de la classe auxquels ils étaient affiliés afin de former de nouvelles classes à eux seuls.

1.1.3.4. Multiplicité de fonction : réactions catalysées, substrats et rôles

Une des caractéristiques principales du P450 est qu'il est capable de métaboliser une multitude de réactions de monooxygénation, dont l'hydroxylation de carbones, d'hétéroatomes, l'époxidation et la déalkylation sont les plus répandues (Isin and Guengerich 2007). Mais ils peuvent également catalyser des réactions de déshydratation, de réduction ou d'isomérisation de motifs carbonés aliphatiques ou aromatiques. La Figure 6 présente un échantillon des réactions effectuées par les P450s.

Les P450s sont capables de métaboliser des substrats très divers, aussi petits que le monoxyde d'azote et aussi gros que les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) (Miles, Ost et al. 2000) ou la cyclosporine A, un undécapeptide (Isin and Guengerich 2007). Cette diversité est retrouvée surtout chez les P450s du métabolisme des xénobiotiques (Gillam 2007). La spécificité de substrat des CYPs est d'ailleurs chevauchante (Coon 2005), en effet une même molécule peut être métabolisée par plusieurs P450s (de séquence parfois très différentes) et plusieurs molécules différentes peuvent être métabolisées par le même P450.

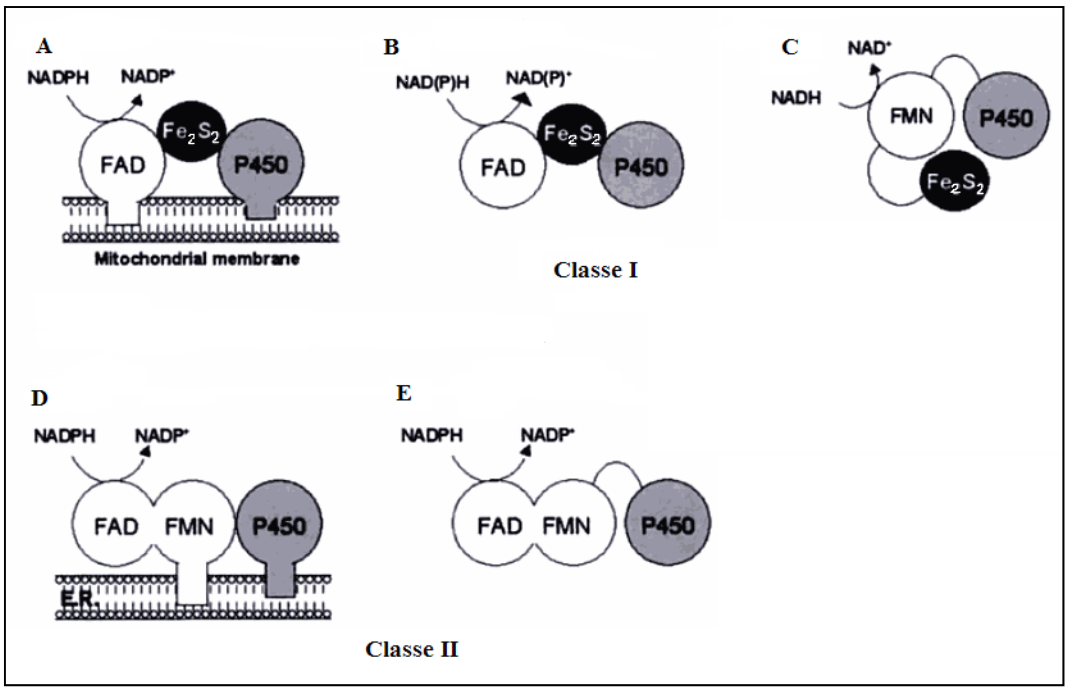


Figure 5. Schéma du transfert d'électrons et des partenaires redox des P450s appartenant à la classe I et II (Paine, Scrutton et al. 2005). FxR : ferredoxine réductase; Fx : ferredoxine. La classe I comprend les P450 mitochondriaux (A), la majorité des P450s solubles avec des FxR à FAD (B) et certains systèmes englobant en une seule protéine multidomaine une FxR à FMN et un P450, comme le CYP116B2 ou le $P450_{RhF}$ (C) (Roberts, Celik et al. 2003). Dans la classe II, les deux partenaires redox sont soit membranaires, chez les eucaryotes (D), soit contenus dans une même protéine multidomaine, comme $P450_{BM3}$ dans la bactérie (E).

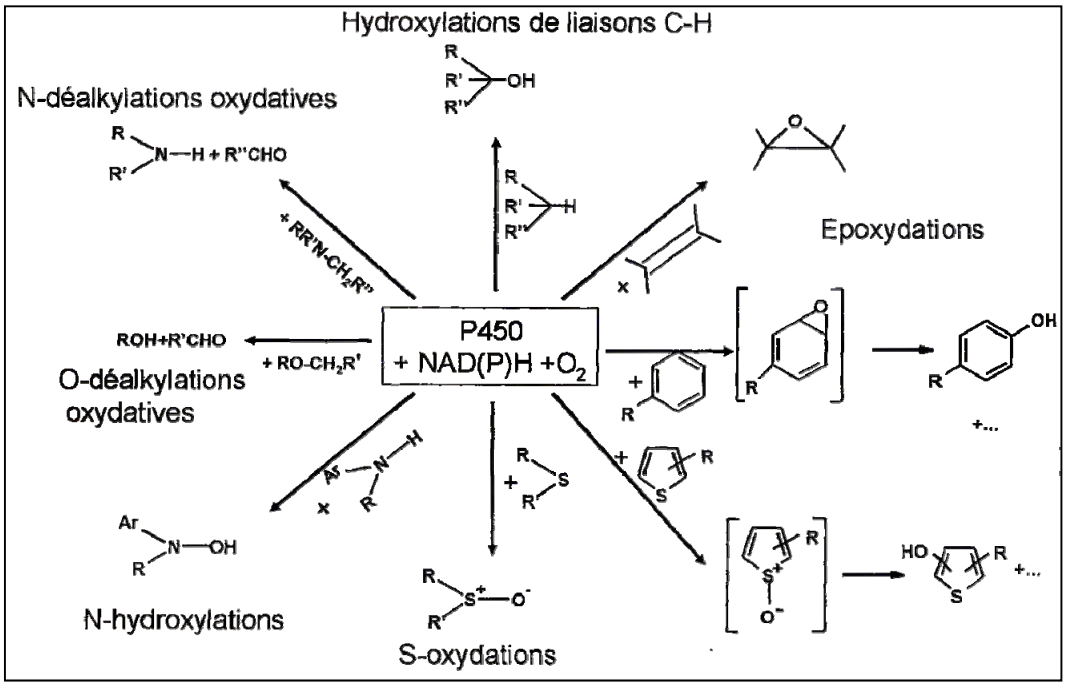


Figure 6. Différentes réactions pouvant être catalysées par les P450s. D'après le cours de Daniel Mansuy (DEA national de Toxicologie, année 1998-1999)

Des cytochromes P450 de la même famille, possédant donc des structures primaires proches, peuvent métaboliser des substrats très différents alors que des P450s de deux familles distinctes métaboliseront des substrats de type très proches. Ces phénomènes peuvent expliquer la lenteur de certaines réactions métabolisées par les P450s (Urban, Truan et al. 2008).

L'observation que les P450s métabolisent autant de substrats est reliée au fait qu'ils interviennent dans de nombreux processus spécifiques à chaque organisme dans lesquels ils sont retrouvés. En effet, ils sont à la fois impliqués dans des processus physiologiques de biosynthèse et de catabolisme de composés endogènes, comme les hormones stéroïdiennes ou encore l'acide rétinoïque chez les animaux, et jouent un rôle clé dans la transformation d'une pléthore de xénobiotiques (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000).

1.1.4. Métabolisme des xénobiotiques :

Les organismes vivants sont sans cesse exposés à des molécules qui leur sont étrangères (xénobiotiques) tels que les médicaments pour l'humain, les polluants environnementaux pour les animaux, les herbicides pour les plantes, les pesticides et les toxines végétales pour les insectes ou encore les composés d'origine alimentaire (Feyereisen 1999 ; Werck-Reichhart and Feyereisen 2000). Ces xénobiotiques peuvent soit être utilisés dans les fonctions cellulaires, soit éliminés.

Déroulement : Chez l'humain, les composés hydrophiles sont, pour la plupart, pris en charge par la fonction rénale. En ce qui concerne les molécules hydrophobes qui ont tendance à se concentrer spontanément dans les membranes biologiques, l'organisme s'est muni d'un système de détoxification composé de nombreux enzymes permettant l'élimination de ces substances en trois phases successives (Figure 7).

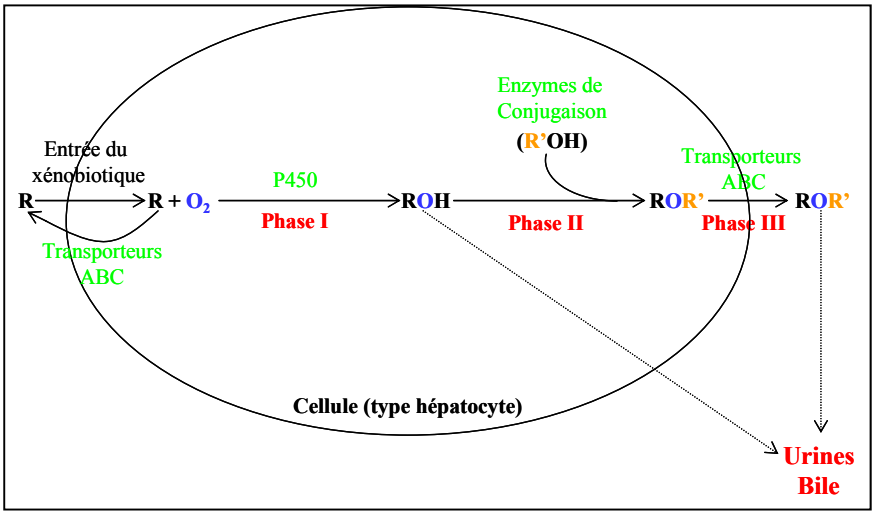


Figure 7. Les trois phases du métabolisme des xénobiotiques. ABC = ATP Binding Cassette

Le principe général de ce système est de transformer les molécules hydrophobes initiales en composés hydrophiles afin que ceux-ci soient plus facilement excrétés par la bile ou les urines. (Gonzalez 1988). La phase I consiste en la greffe d'un groupement réactif sur le xénobiotique, majoritairement par les P450s, mais aussi par les alcool déshydrogénases ou encore les xanthine oxydases. La phase II, réalisée par des enzymes dites de conjugaison (le plus souvent des transférases) permet l'ajout d'un groupement hydrophiles sur le xénobiotique fonctionnalisé (Gonzalez and Kimura 1999). La phase III fait intervenir des transporteurs ATP dépendants afin de réaliser l'efflux dans les milieux aqueux intercellulaires des xénobiotiques modifiés (Vore 1994).

Régulation : La grande variabilité interindividuelle d'expression des P450s constatée au sein d'une population peut être due à de nombreux facteurs. Outre le polymorphisme génétique, il existe aussi une influence de l'âge, du sexe, de facteurs environnementaux tels que la prise de médicaments, l'alimentation et l'hygiène de vie ainsi que des facteurs physiopathologiques (Liska 1998; Handschin and Meyer 2003; Singh, Parmar et al. 2008). Tous ces paramètres jouent sur l'induction ou l'inhibition de l'expression des différentes formes de P450 (http://www.edhayes.com/startp450.html), ce qui peut avoir des effets critiques sur le métabolisme des xénobiotiques. Récemment, les mécanismes de signalisation cellulaire responsables de la régulation génétique ou épigénétique de l'expression des gènes de P450 ont été étudiés de façon approfondie. Ces mécanismes impliquent, entre autres, des récepteurs membranaires. La fixation de leurs ligands extracellulaires induit la translocation des complexes ainsi formés dans le noyau où ils jouent le rôle de facteurs de transcription (Waxman 1999) (Exemple en Figure 8).

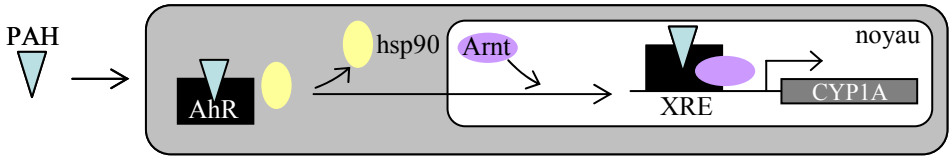


Figure 8. Régulation de l'expression des CYPs 1A par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), AhR=récepteur des hydrocarbures aromatiques, hsp90=protéine de choc thermique 90, Arnt=translocateur nucléaire de l'AhR, XRE=élément de réponse (RE) aux xénobiotiques

Toxicité cellulaire associée : Les produits de transformation des xénobiotiques par les P450s entraînent parfois la formation de molécules extrêmement réactives. Si elles ne sont pas prises en charge par les enzymes de phase II, ces métabolites, souvent électrophiles, peuvent réagir avec les macromolécules nucléophiles de la cellule. L'attaque des acides nucléiques peut notamment, par formation d'adduits à l'ADN, induire une mutagenèse aboutissant à l'initiation de processus de cancérogenèse (Harris 1989). Certaines molécules, lorsqu'elles sont prises en charge par un P450, forment des adduits covalents avec l'enzyme.

Ces composés dit “suicides” induisant parfois la synthèse d’auto-anticorps contre le complexe enzyme-substrat, impliqués dans le développement d’hépatites auto-immunes (Zanger, Hauri et al. 1988 ; Loeper, Descatoire et al. 1993). L’occurrence de phénomènes de découplage du cycle catalytique libère dans le cytoplasme des espèces réactives impliquées dans le stress oxydatif, ce qui induit des phénomènes de mort cellulaire, par apoptose ou par nécrose (Davydov 2001). L'état des connaissances actuelles montre que les P450s humains sont impliqués dans le métabolisme de 75% des médicaments, 95% de ceux-ci étant métabolisées par seulement cinq P450 différents. Ceci explique l’observation d’un très grand nombre d’interactions médicamenteuses impliquant ces enzymes (Guengerich 2008) (http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm).

1.1.5. Evolution

La diversification des P450s aujourd’hui impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques serait en partie une conséquence des interactions entre les animaux et les plantes (animal-plant warfare) (Gonzalez and Nebert 1990). En effet, les plantes, pour se défendre, ont développé un métabolisme secondaire, *via* les P450s, pour synthétiser une panoplie de molécules toxiques. En réponse, les espèces animales ont diversifié leur système enzymatique pour détoxifier ces molécules.

Ceci aurait été rendu possible par divers processus de modifications des gènes de P450 au cours de l’évolution, dont une grande réorganisation du positionnement des introns (Rozman, Stromstedt et al. 1996). En outre, il n’est pas possible d’ignorer l’évolution convergente de P450s de familles différentes mais possédant la même spécificité de substrat (par exemple pour les sites de liaison du substrat ou les segments d’ancrage à la membrane) (Degtyarenko and Archakov 1993).

En plus de la multiplicité de gènes, due à une association de nombreux phénomènes évolutifs, les P450s présentent également une grande diversité dans beaucoup d’autres domaines. En effet, ils sont capables de métaboliser une pléthore de substrats endogènes ou exogènes de multiples façons, dans des buts variés et avec une spécificité plus ou moins large. Ceci avec le concours de partenaires redox également variables selon les organismes et la localisation des P450s dans ceux-ci. Cette diversité est particulièrement prononcée chez les enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques.

1.1.6. Expression hétérologue

Le clonage des séquences de P450, surtout de ceux impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, beaucoup étudiés, a permis leur expression hétérologue dans différents systèmes (Waterman 1994). Dans la grande majorité des cas, l’expression transitoire ou stable d’un ou plusieurs P450s du métabolisme des xénobiotiques est achevée par transformation ou transfection d’un vecteur (intégratif ou réplicatif) portant une ou plusieurs cassettes d’expression (Pompon, Gautier et al. 1997).

Une telle cassette est constituée d'une phase ouverte de lecture d'un cDNA entouré de régions 5'- et 3'- non codantes arborant des séquences d'initiation et de terminaison de la transcription spécifiques de l'hôte, les systèmes d'expression les plus répandus sont décrits ci-après.

- ***E.coli :***

Ses coûts d'entretien relativement bas, la facilité de production d'importants volumes de culture et la disponibilité de nombreux vecteurs d'expression font d'*E.coli* un hôte avantageux. L'inconvénient majeur est la nécessité de remanier la séquence nucléotidique et protéique des P450s eucaryotes pour assurer une expression correcte (Barnes, Arlotto et al. 1991).Afin d'obtenir une activité catalytique efficace, les P450s eucaryotes sont couplés avec leur propre système de transfert d'électrons. Ceci peut se faire par le mélange *in vitro* des différentes protéines purifiées après expression (Guengerich, Martin et al. 1996) ou par co-expression à la membrane du P450 et de la réductase avec un ou deux vecteurs (Dong and Porter 1996 ; Kranendonk, Fisher et al. 1999). Récemment, de la bioconversion de substrats a également été effectuée sur cellules entières par des P450s couplés à divers partenaires redox (Uno, Okamoto et al. 2008).

- ***Cellules d'insectes et baculovirus :***

L'expression dans les cellules d'insectes est basée sur le système du vecteur d'expression du baculovirus (Smith, Summers et al. 1983) qui, en une seule inoculation dans une culture de cellules en suspension, permet une propagation rapide du vecteur d'expression à toute la culture, puis la production de la protéine recombinante en grande quantité. Un des avantages des cellules d'insectes est qu'elles permettent un bon repliement et parfois la réalisation de modifications post-transcriptionnelles et traductionnelles. Ce système permet également l'expression de P450 et de réductase à la membrane du réticulum endoplasmique (Lee, Kadwell et al. 1995) Mais le clonage de l'ADNc recombinant, fastidieux, la régulation très fine des conditions de culture afin d'éviter la dégradation de la protéine recombinante (Crespi and Miller 1999) et son coût relativement élevé sont quelques inconvénients de cette méthode.

- ***Cellules eucaryotes :***

L'avantage de travailler avec des lignées cellulaires eucaryotes est qu'il existe dans certaines d'entre elles une expression basale de réductase et/ou de b5 et que les P450s sont exprimés dans leur environnement physiologique, ce qui peut être important en cas de modifications post-translationnelles et traductionnelles. L'expression concomitante d'autres partenaires redox est également possible si nécessaire. Les niveaux d'expression sont généralement relativement faibles et la production de la plupart des CYPs semblent affecter la croissance des cellules (Crespi and Miller 1999).

- ***S.cerevisiae :***

L'expression dans la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* partage beaucoup d'avantages avec l'expression bactérienne dans le sens que ce microorganisme non pathogène (ne possédant que 3 CYPs endogènes) permet l'obtention de gros volumes de culture de façon peu coûteuse. La levure est un organisme eucaryote qui possède une organisation intracellulaire et un système de transport très similaire de celui des cellules de mammifères, indispensable à l'expression des CYPs membranaires (Pompon, Gautier et al. 1997). De plus des vecteurs d'expression comportant des marqueurs de sélection et facilement transformables ont été construits, contenant l'ADNc recombinant placé à la suite d'un promoteur de levure constitutif ou inductible par le galactose (Urban, Cullin et al. 1990), permettant l'obtention d'importantes quantités de protéine. Le clonage de l'ADNc d'intérêt dans ces vecteurs d'expression peut se faire en utilisant soit les techniques classiques soit la haute capacité de recombinaison homologue de la levure. Malgré le fait que la levure exprime de façon endogène une P450 réductase et du b5, les niveaux d'expression sont faibles et le peu d'identité de séquence entre ces enzymes et leurs homologues mammifères conduit souvent à un transfert d'électrons déficient (Urban, Cullin et al. 1990; Truan, Cullin et al. 1993). Afin de remédier à cela, des souches de levures comprenant un environnement redox optimisé pour les P450s animaux ont été construites (Figure 9) (Urban, Truan et al. 1994), afin de recréer dans la cellule des conditions proches de celles existant dans les hépatocytes humains, lieu d'expression majoritaire des CYPs. En effet, la levure est capable de supporter plusieurs coexpressions hétérologues. En sus de l'expression constitutive du gène de la réductase de *S. cerevisiae*, les gènes de la réductase humaine, du b5 ou de la réductase de levure sont intégrés dans le génome sous contrôle d'un promoteur inductible, les gènes de P450 étant portés par le vecteur d'expression (Truan, Cullin et al. 1993; Urban, Truan et al. 1993; Pompon, Louerat et al. 1996). Ce système de levure optimisé a rendu possible la réalisation efficace *in vivo* d'activités monooxygénases hétérologues uniques, catalysées par des CYPs (Urban, Truan et al. 1994). Dans la plupart des cas, une diffusion spontanée du xénobiotique étudié et de ses métabolites à travers la membrane plasmique de la levure est observée, ainsi que l'accumulation des métabolites dans le milieu de culture. Les niveaux d'expression observés pour les CYPs sont tels qu'il est possible de réaliser des analyses spectrophotométriques et biochimiques détaillées d'un unique CYP animal, directement à partir des fractions microsomales, sans purification supplémentaire. De plus, l'absence de détection de CYP de levure endogène dans les conditions de culture utilisées permet de calculer des constantes catalytiques absolues et des constantes de dissociation du substrat dans un environnement membranaire physiologique (Pompon, Gautier et al. 1997). Un des inconvénients de ce système est la sélection parfois longue de l'environnement redox le plus adéquat pour l'activité catalytique d'un P450, et la nécessité d'utiliser un ADNc, la levure ne pouvant effectuer le processus d'épissage des ARNm animaux.

L'expression hétérologue des P450s a notamment permis l'étude de la structure de certains des P450s de cette superfamille présentant une si grande diversité. Il est en effet intéressant de savoir comment cette multiplicité de fonctions et de séquences observées se traduit au niveau de la structure protéique et inversement.

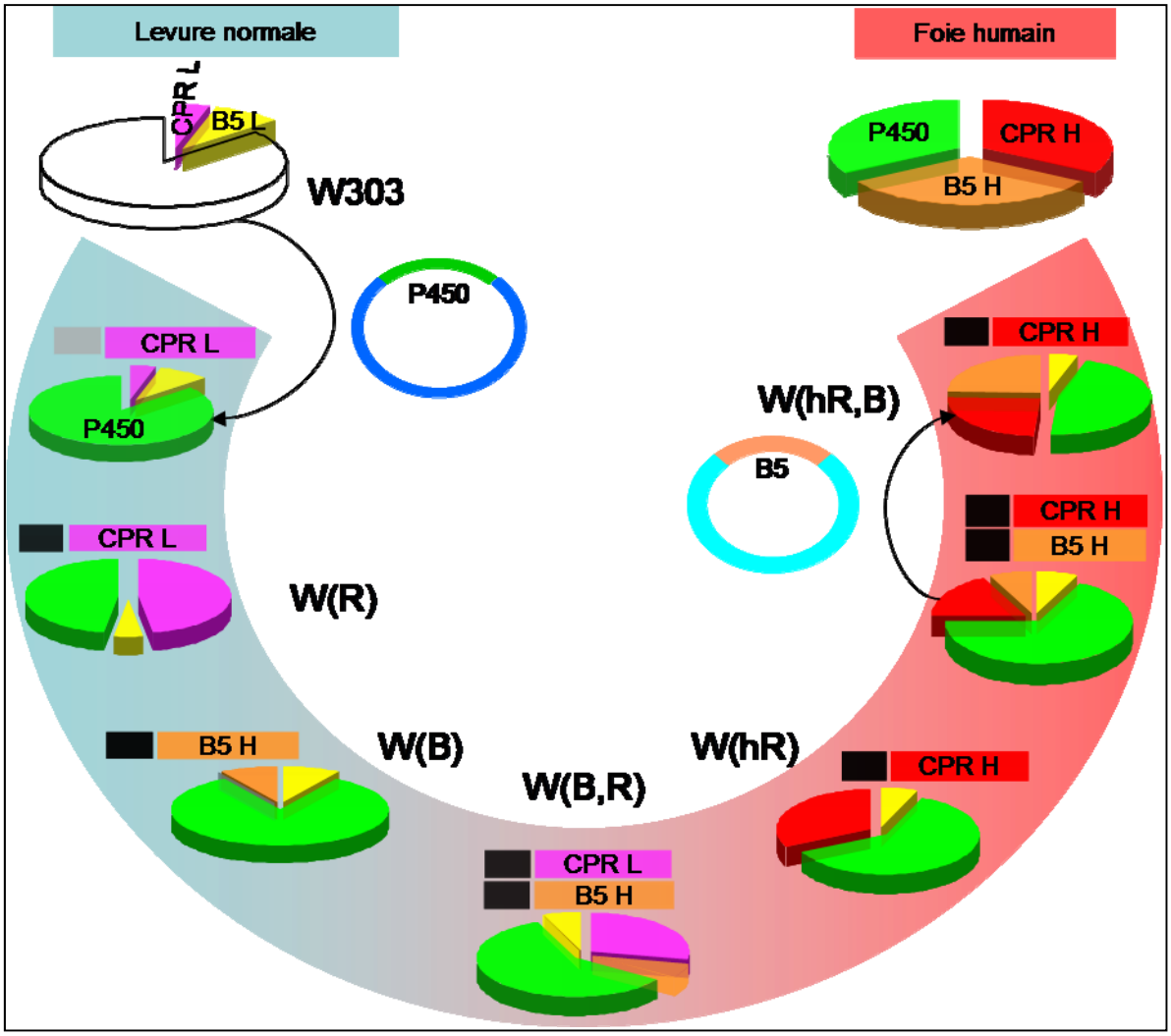


Figure 9. Différentes souches de levure présentant des environnements redox différents. Le diagramme en haut à droite représente la distribution des différents partenaires redox du système P450 dans les hépatocytes. Chaque souche est nommée W(X) comme indiqué, X étant caractéristique des partenaires redox qu'elle contient. Chaque partie des autres secteurs représente la proportion d'un partenaire redox par rapport à tous les partenaires redox présents. CPR L = cytochrome P450 réductase de levure ; B5 L = cytochrome b5 de levure ; CPR H = cytochrome P450 réductase humaine ; B5 H = cytochrome b5 humain. Les flèches représentent la transformation de la souche initiale par le plasmide réplicatif indiqué, les autres souches ont été transformées de manière intégrative.

1.2. Structure des P450s

1.2.1. Chronologie

La première découverte d'importance pour la compréhension de la structure des P450s fut la résolution de la structure du $P450_{cam}$ (Poulos, Finzel et al. 1985) par cristallographie aux rayons X. Cette structure a permis de définir une nomenclature des structures secondaires du P450 qui est encore utilisée aujourd'hui.

Cette structure a également servi de base à Gotoh afin de réaliser des alignements de séquences de P450s prenant en compte des éléments de structure secondaire en plus des éléments de structure primaire. Ces alignements lui ont permis de formuler l'hypothèse de la présence de régions variables dans la séquence des P450s, étant responsable des spécificités de substrat différentes (Gotoh 1992).

Ces deux études ont été les points de départ de nombreuses autres ayant permis de déterminer les régions conservées et variables de la structure primaire des P450s, représentées sur la Figure 10 et transposées sur la structure cristalline du CYP2B4 (Figure 11).

C'est seulement au début des années 90 que d'autres structures de P450s solubles bactériens ont été résolues. Quant à la première structure cristalline du CYP2C5 de mammifère, elle n'a été obtenue qu'en 2000, la solubilisation par remaniement du segment transmembranaire des P450s eucaryotes ayant été difficile à réaliser (Williams, Cosme et al. 2000). Après cette structure, d'autres P450s mammifères, surtout de la famille 2, ont été cristallisés. Toutes ces structures cristallines ont été très utiles afin d'avoir une vue d'ensemble du repliement des P450s. Des informations complémentaires sur le même sujet ont également été obtenues plus tard grâce à des expériences de modélisation moléculaire (Lewis, Dickins et al. 1999 ; Lewis, Dickins et al. 2003).

En parallèle, le $P450_{cam}$ avait déjà été cristallisé en présence de plusieurs substrats ou inhibiteurs, permettant de mieux définir le site actif de cet enzyme (Poulos, Finzel et al. 1987) (Raag, Li et al. 1993). D'autres structures déterminées en présence de substrats ou d'inhibiteurs ont été très utiles à une meilleure compréhension des "mouvements" fins et de l'adaptation de la structure pouvant avoir lieu au sein de la protéine lors de l'interaction avec une molécule (Scott, He et al. 2003; Williams, Cosme et al. 2004).

La dernière avancée bioinformatique dans le domaine structural a été la réalisation d'études de dynamique moléculaire sur des modèles de P450 (Ludemann, Lounnas et al. 2000; Ludemann, Lounnas et al. 2000) permettant de déterminer les zones plus ou moins flexibles d'un P450 au cours d'une échelle de temps donnée. Ceci peut permettre de déterminer notamment les mécanismes d'entrée et de sortie des substrats dans la protéine (Cojocaru, Winn et al. 2007) ou encore les mouvements des acides aminés du site actif afin de s'adapter à un substrat (Ravindranathan, Gallicchio et al. 2006).

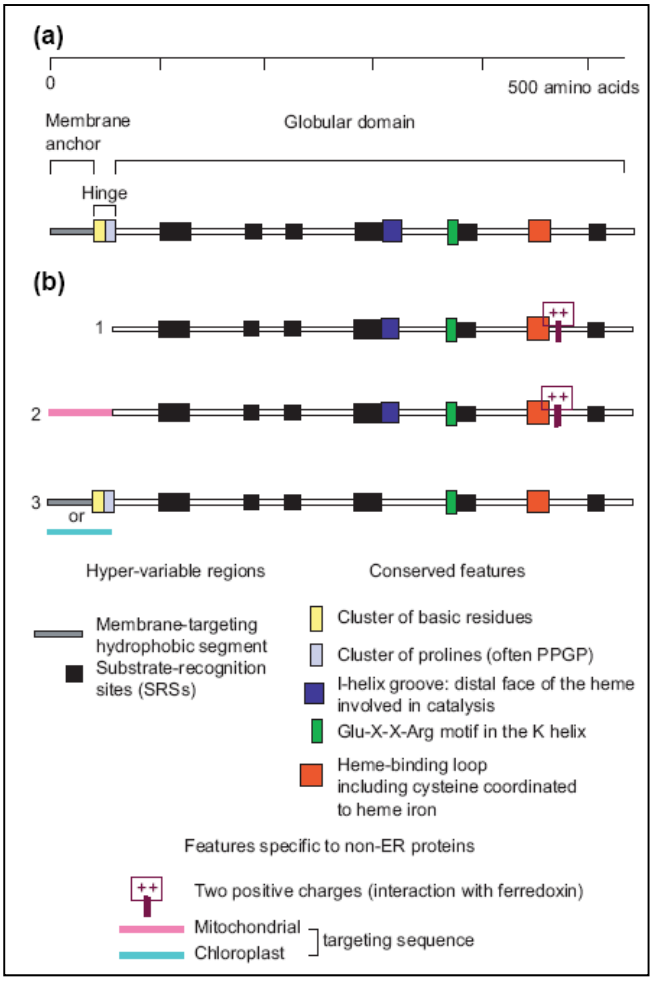


Figure 10. Structures primaires des cytochromes P450. (a) Organisation typique d'un P450 de la membrane du réticulum endoplasmique (enzyme de classe II). (b) Variants de cette structure canonique les plus communément trouvés: 1. P450 soluble de classe I; 2. P450 mitochondrial de classe I; 3. P450 membranaire ou plastidien de classe III (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000).

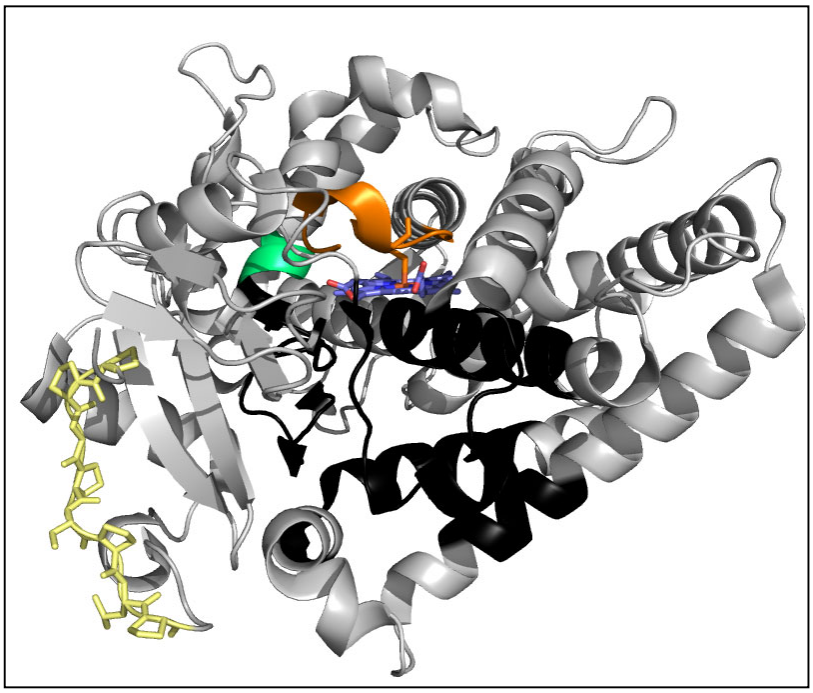


Figure 11. Eléments conservés et variables de la structure primaire des P450s membranaires de type III (type (b)3 dans la Figure 10). La protéine est en gris, l'hème en bleu, le groupe de prolines en jaune pâle et les SRS en noir. Les séquences EXXR et la séquence contenant la cystéine catalytique, conservées, sont respectivement en vert et en orange. Le segment hydrophobe d'adressage à la membrane et le groupement de résidus basiques, en N-terminal, sont absents de la structure cristalline.

Quant à la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), elle n'est pas indiquée pour la résolution de structures de protéines de grande taille comme les P450s. Mais elle peut être très utile dans le cadre d'autres expériences dynamiques, notamment lors d'études du changement de spin du fer de l'hème, des mouvements fins et des zones impliquées de la protéine au cours d'interactions des P450s avec des substrats (Modi, Primrose et al. 1995; Jovanovic, Farid et al. 2005 ; Jovanovic and McDermott 2005) ou des partenaires redox (Wei, Pochapsky et al. 2005). D'autres études structurales récentes ont également été réalisées par RMN du solide, permettant d'étudier des P450s mitochondriaux ou microsomaux natifs, car fixés à une membrane, en présence de certains partenaires redox (Durr, Waskell et al. 2007; Rupasinghe, Duan et al. 2007).

1.2.2. Structure primaire

1.2.2.1. Eléments conservés

En premier lieu, deux séquences protéiques sont considérées comme des signatures peptidiques de la superfamille des P450s (Nelson and Strobel 1988).

La première séquence conservée, située du côté proximal de l'hème, contient la cystéine ligand. Elle participe au maintien l'hème au sein de l'apoprotéine et est utilisé pour identifier les P450s dans la base PROSITE de la Protein Data Bank (PDB) (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

[FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKPHT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD][1]

La deuxième séquence signature, se trouvant du côté distal, jouerait un rôle dans l'activation de l'oxygène moléculaire lors de la catalyse via la thréonine.

(A/G)-G-x-(E/D)-T

Cette séquence signature est moins bien conservée que la première. La thréonine, notamment, est absente de certains CYPs de classe III dont les substrats ne nécessitent pas d'activation de l'oxygène moléculaire. L'activation de l'oxygène moléculaire peut également être assurée par d'autres mécanismes ou d'autres acides aminés, l'exemple le plus connu étant celui du P450eryF, possédant une alanine à la place de la thréonine (Meharenna, Slessor et al. 2008).

Le motif E-x-x-R de l'hélice K (la nomenclature de désignation des éléments de structure secondaire est détaillée dans le paragraphe suivant), sur la face proximale de l'hème, est aussi très bien conservé et sert probablement à stabiliser le cœur de la structure protéique.

[1] Par nomenclature, les crochets "[ ]" correspondant aux résidus possibles à la position donnée, le caractère x, à n'importe quel résidu, et les accolades "{ }" à un résidu facultatif à une position donnée.

Egalement, le signal d'arrêt de transfert des P450s eucaryotes est fréquemment suivi par un groupe de prolines (P-P-X-P) qui forme un coude entre l'ancre membranaire amino-terminale hydrophobe et la partie globulaire de la protéine (Williams, Cosme et al. 2000).

1.2.2.2. Eléments variables : les Sites de Reconnaissance de Substrat (SRS)

En 1992, Gotoh décide d'utiliser les informations de la seule structure tridimensionnelle alors connue, celles du CYP101 ou $P450_{cam}$ (Poulos, Finzel et al. 1985), afin d'étudier par alignement de séquences les zones pouvant potentiellement intervenir dans la reconnaissance et la liaison du substrat dans les P450s. Mais les faibles taux d'homologie entre les enzymes eucaryotes et bactériennes (de l'ordre de 12 à 20%) rendaient les alignements difficiles.

Gotoh propose alors une amélioration de l'alignement en s'appuyant, non pas seulement sur la structure primaire, mais également sur des prédictions de structures secondaires disponibles à l'époque pour certains P450s eucaryotes de la famille 2 (Gotoh 1992).

Gotoh repère sur un alignement de 51 séquences de CYP2 avec 8 séquences bactériennes les parties les plus conservées et celles présentant le plus haut taux de mutations non silencieuses par rapport au reste de la séquence. Il identifie ainsi 6 parties avec un haut taux de variabilité qu'il désigne comme Sites de Reconnaissance du Substrat (ou SRS), régions d'interaction possibles entre le substrat et l'apoprotéine (Figure 12). Ces SRS sont distribués tout le long de la séquence primaire du CYP et représente environ 16% des résidus totaux.

A l'époque, les régions ou les acides aminés de CYPs de la famille 2, déterminés comme importants pour la reconnaissance de certains substrats par des études de mutagenèse et de chimérogenèse, sont tous situés dans ces SRS, démontrant les conclusions de Gotoh. Beaucoup d'autres d'études de ce type utilisant les conclusions de Gotoh ont ensuite été menées.

Certaines études (He, Balfour et al. 1992 ; Szklarz, He et al. 1996) ont confirmé l'hypothèse de Gotoh pour la famille 2, en démontrant l'implication d'acides aminés des SRS dans la reconnaissance de substrats et parfois, indirectement, la spécificité de substrats.

L'importance de ces résidus a également été prouvée dans le cadre de la reconnaissance et la spécificité de substrats d'autres familles, comme pour le CYP3A4 (Roussel, Khan et al. 2000) ou les CYP4A (Loughran, Roman et al. 2000).

Mais d'autres expériences menées sur des membres de la famille 2B (He, Szklarz et al. 1996; Domanski, Schultz et al. 1999) et 2C (Ibeanu, Ghanayem et al. 1996 ; Biagini, Philpot et al. 1999) ont montré que certains résidus hors des SRS pouvaient également jouer un rôle crucial dans la reconnaissance et la spécificité de substrat.

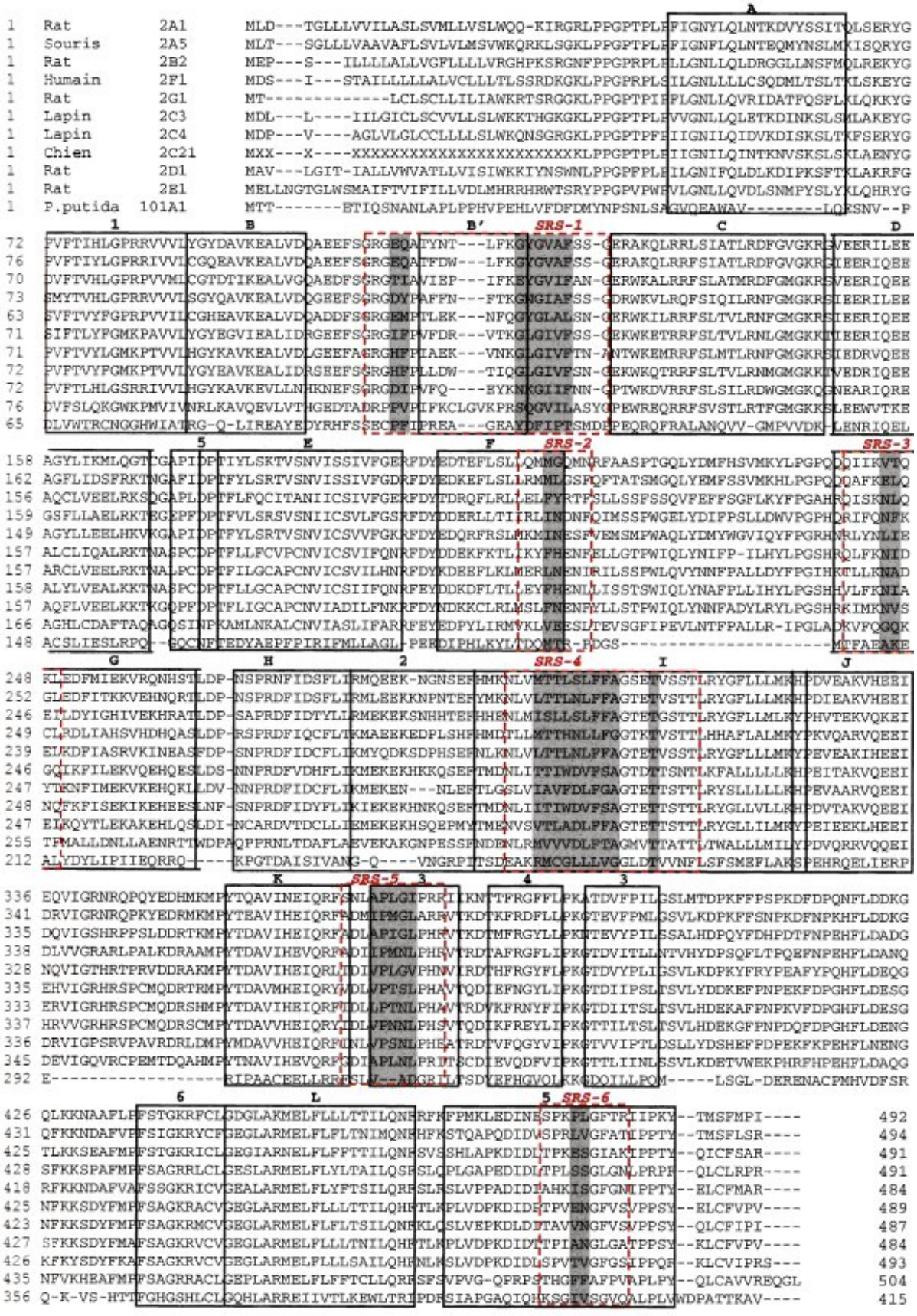


Figure 12 d'après (Gotoh 1992). Alignement de séquences multiples entre les CYP2 membranaires et le $P450_{cam}$ (Miles, Ost et al. 2000). Les régions correspondant aux hélices et aux feuillets du $P450_{cam}$ sont encadrées par un trait plein. Les zones surlignées en gris correspondent aux résidus de liaison au substrat dans le $P450_{cam}$ (Laughton, Neidle et al. 1990)

1.2.3. Structure secondaire

Les éléments de structure secondaire sont désignés par une nomenclature initialement proposée par Poulos (Poulos, Finzel et al. 1985), s'appuyant sur l'étude de la structure cristalline du CYP101. Cette nomenclature, décrite en Figure 13 et représentée sur la structure du CYP2C5 en Figure 14, a été modifiée légèrement au fur et à mesure de la découverte de nouvelles structures secondaires.

Les hélices α sont identifiées par des lettres majuscules (auxquelles des ' ou des '' viennent s'ajouter) tandis que les feuillets β sont désignés par des chiffres de 1 à 5.
Cette figure montre aussi que la structure des CYPs est divisible en deux domaines : une région riche en hélices α, bien structurée à droite de la figure et une seconde région constituée principalement de feuillets β et de boucles, donc plus flexible, à gauche de la figure. Le domaine β est souvent associé à la reconnaissance du substrat et au canal d'accès et le domaine α au centre catalytique (Raucy and Allen 2001). Dans la région riche en hélices α, la longue hélice I distale d'une trentaine de résidus traverse la molécule de part en part. L'hélice L, dite proximale (Hasemann, Kurumbail et al. 1995), contient la cystéine conservée.

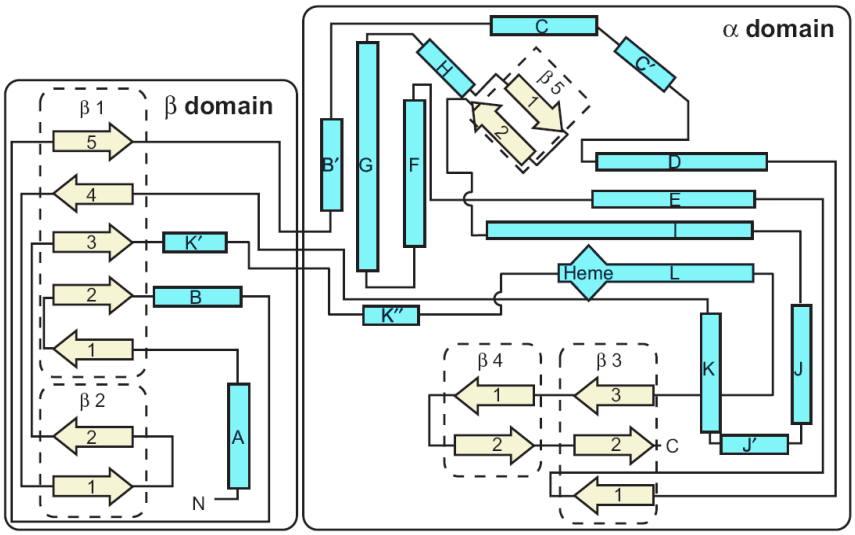


Figure 13. Diagramme topologique montrant l'arrangement des structures secondaires dans un P450 typique (CYP102). Les hélices α sont représentées par des rectangles, les feuillets β par des flèches, les boucles par des lignes. Les tailles des éléments ne sont pas proportionnelles à leurs longueurs réelles dans la séquence primaire (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000).

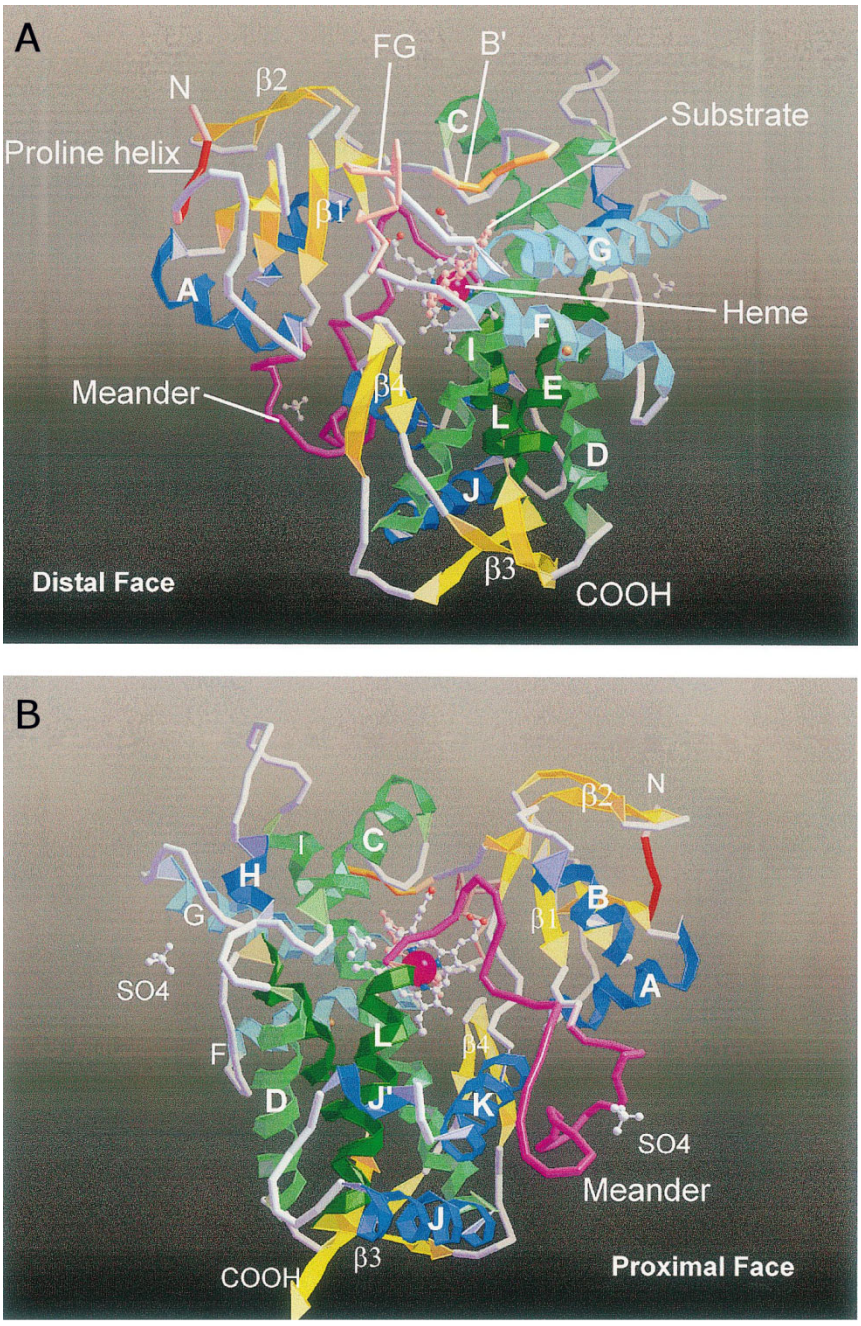


Figure 14. Représentation des faces distales (A) et proximales (B) du CYP2C5 (Williams, Cosme et al. 2000), les éléments de structure secondaire étant notés selon la nomenclature de la Figure 13. Les extrémités N- et C- terminales de la protéine sont respectivement indiquées par les symboles N et COOH. L'hème et un substrat sont représentés en "boules et bâtons" respectivement gris et rose. L'hélice I est proche du site de fixation du substrat tandis que l'hélice L fixe l'hème. La partie proximale du P450 (B) est impliqué dans la reconnaissance des partenaires redox et le transfert d'électrons au site actif alors que les protons arrivent au site actif par la face distale (A) (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000).

1.2.4. Structure tertiaire/Repliement

La détermination d'un nombre important de structures cristallographiques tridimensionnelles de P450s depuis celle du CYP101 (Poulos, Finzel et al. 1985) a permis de montrer que la grande variabilité de leurs séquences primaires n'empêchent pas les P450s de présenter un repliement structural très conservé (Otyepka, Skopalik et al. 2007) (Figure 15). Les structures ont une forme de prisme triangulaire dont la hauteur mesure environ 65 Å et la base 35 Å. Ce repliement est totalement spécifique aux CYPs.

Les structures cristallographiques de CYPs eucaryotes microsomaux ne sont pas celles d'enzymes natifs (ils sont délétés de leur ancre membranaire N-terminale hydrophobe, remplacée par des résidus hydrophiles pour rendre l'enzyme plus soluble), mais leurs activités et cinétiques restent inchangées (von Wachenfeldt, Richardson et al. 1997 ; Cosme and Johnson 2000), tendant à prouver que ces modifications n'affectent pas le repliement de ces P450s en particulier.

Concernant les P450 s mitochondriaux, aucune structure cristalline n'a été résolue à ce jour. Ceci est notamment du au fait que ces P450s interagissent étroitement avec la membrane mais n'y sont pas intégrés (Schwarz, Richter et al. 1994) via une ancre membranaire comme les P450s microsomaux (Nelson and Strobel 1988). Les interactions avec la membrane se feraient directement par liaison avec certains acides aminés (von Wachenfeldt and Johnson 1995 ; Headlam, Wilce et al. 2003). Il est donc très difficile de solubiliser ces CYPs sans compromettre leur repliement et leur fonctionnalité.

1.2.4.1. Eléments variables

Les parties les plus variables sont les hélices A, B, H, K', les feuillets β3, β4 et plus particulièrement les hélices B', F, G et la boucle F-G (ou les hélices F' et G' chez les P450s membranaires). Ces structures de la cavité distale, au-dessus de l'hème, font vraisemblablement partie du site actif et des canaux potentiels d'accès au substrat, particulièrement flexibles afin de s'adapter au substrat à oxyder (Graham and Peterson 1999). La boucle F-G semble également être impliquée dans la liaison à la membrane (Pernecky, Larson et al. 1993).et dans l'orientation du canal d'accès vers la surface membranaire (Graham-Lorence, Amarneh et al. 1995 ; Williams, Cosme et al. 2000 ; Williams, Cosme et al. 2000).

De plus, l'hélice B' fait partie du SRS1 défini par Gotoh (Gotoh 1992) et il a été observé ensuite que la boucle F-G, très hydrophobe, était structurée en deux hélices F' et G' chez les P450s eucaryotes (Wester, Johnson et al. 2003 ; Scott, Liu et al. 2004), formant le toit du site actif.

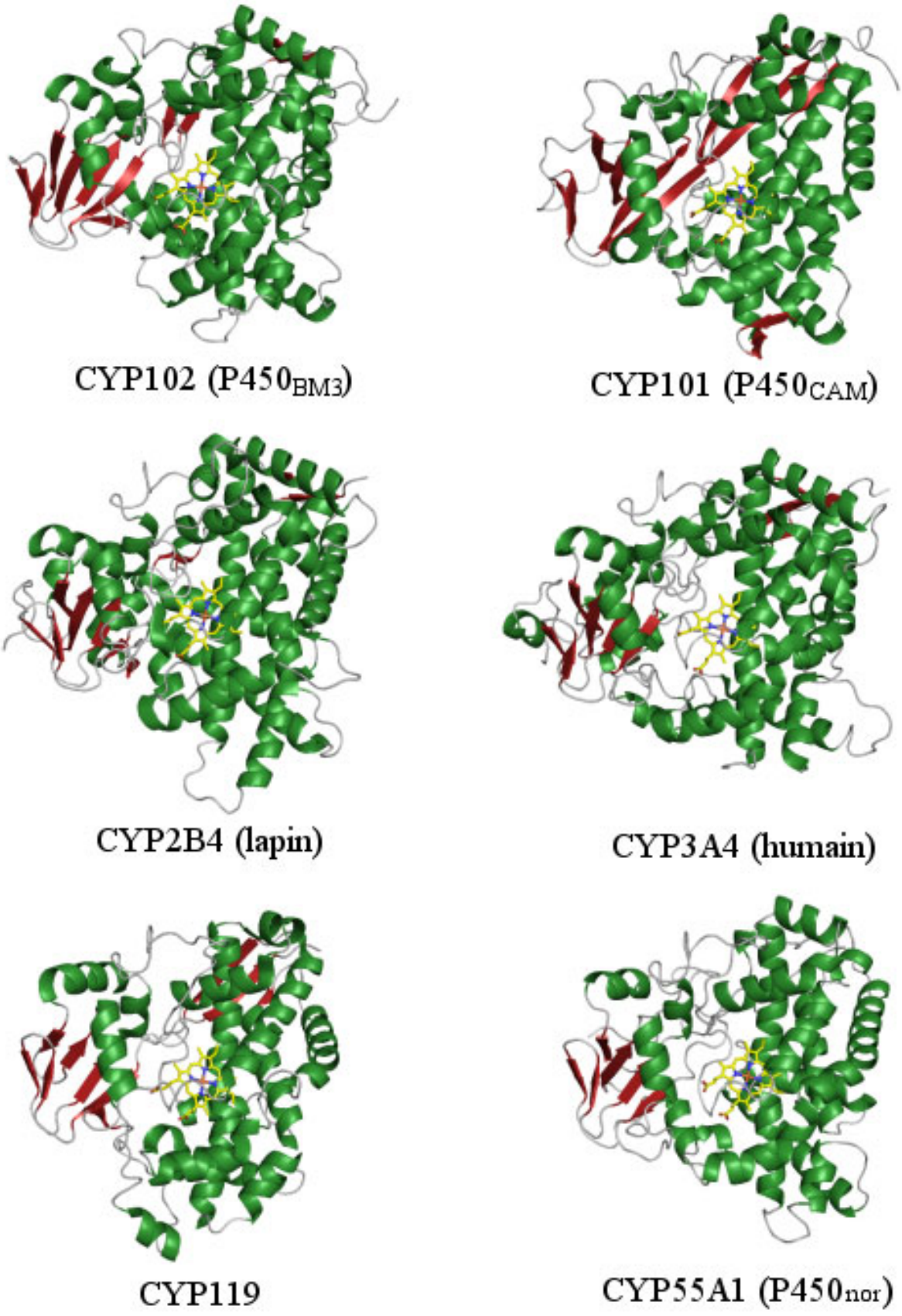


Figure 15. Structures tridimensionnelles de divers P450s bactériens (CYP101 et 102), archéen (CYP119), fongique (CYP55A1) et mammifères (CYP2B4 et 3A4). Les hélices, les feuillets et l'hème sont représentés en vert, en rouge et en jaune, respectivement.

1.2.4.2. Eléments conservés

Les régions structurales les plus conservées dans toutes les structures sont celles qui participent à la chimie d'activation de l'oxygène, autour de l'hème. La première d'entre elles contient une partie de l'hélice L et la cystéine proximale.

Afin d'assurer une stabilisation de ce ligand cystéinate, une structuration particulière très conservée de la boucle la contenant (Cys-pocket) a ainsi été observée dans toutes les structures. La seconde région bien conservée est la partie C-terminale distale de l'hélice I (Graham and Peterson 1999). Dans l'ensemble, le groupe des hélices D, E, I et L ainsi que les hélices J et K sont également bien conservées.

Toutes les études sur la structure primaire et les structures cristallographiques des P450s montrent donc que, malgré le fait qu'il n'y ait que 3 acides aminés totalement conservés dans toute la superfamille de ces enzymes, leur structure a été conservée au cours de l'évolution (Podust, Poulos et al. 2001).Celle-ci a la forme d'un prisme contenant un hème en son cœur, dont les résidus sont hautement conservés.

1.2.5. Co-cristallisation avec un ligand

Ces structures sont les premières à avoir mis en évidence la grande adaptabilité du site actif du P450 et d'émettre des hypothèses sur les mouvements de la protéine lors de la liaison du substrat (Poulos, Finzel et al. 1987). Parmi celles de mammifères, les premières à avoir été réalisé sont celles du CYP2C5 (Wester, Johnson et al. 2003; Wester, Johnson et al. 2003) cocristallisé avec deux ligands dont la taille et la polarité diffèrent. Mais la structure la plus riche en informations reste celle du CYP2B4 de lapin non complexée (Scott, He et al. 2003). Cette structure présente une large ouverture entre les hélices F et G d'une part et l'hélice B' d'autre part. Deux autres structures du CYP2B4 complexées avec deux ligands de taille très différentes mettent en évidence la grande flexibilité de la protéine dans cette région qui permet la "fermeture" du CYP autour de ces substrats (Figure 16) (Scott, White et al. 2004 ; Zhao, White et al. 2006).

Les études de co-cristallisation ont permis de mettre en évidence l'aspect dynamique du P450, très flexible dans certaines régions afin de s'adapter pour interagir au mieux avec les substrats. Elles ont également permis de mieux comprendre comment un seul P450 était parfois capable de métaboliser des substrats très différents en taille et en polarité.

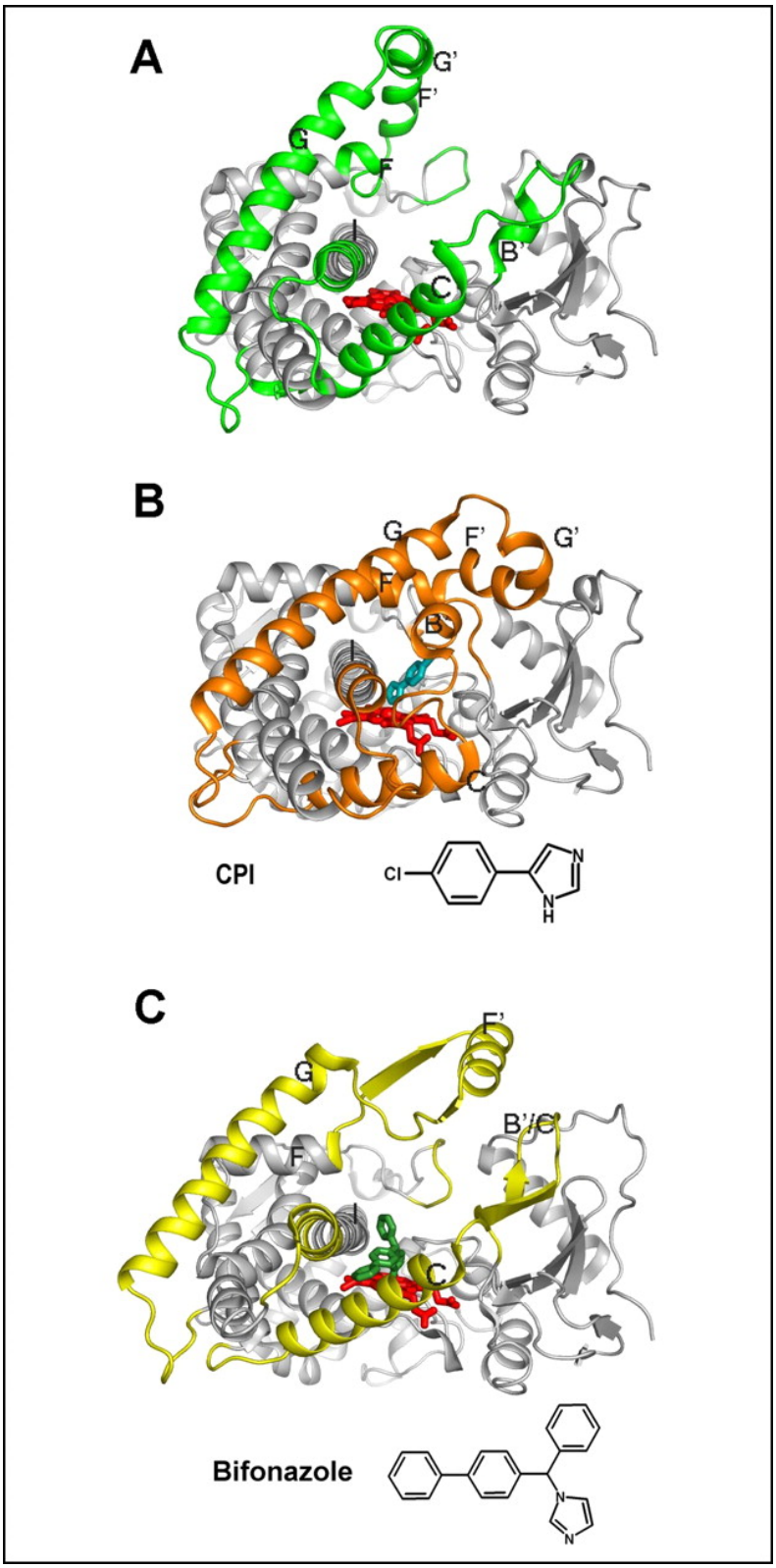


Figure 16. A. Structure du CYP2B4 sans ligand, B. Structure du CYP2B4 complexé avec le 4-(4-chlorophenyl) imidazole ou CPI. La formule chimique du CPI est indiquée en dessous de la structure, C. structure du CYP2B4 complexé avec le bifonazole. La formule chimique du bifonazole est indiquée en dessous de la structure. Les trois structures sont représentées avec la même orientation par alignement des structures tertiaires les mieux conservées (résidus 61–98 et 306–465). Quatre régions autour du site actif (résidus 100–140, 203–262, 276–290, et 474–479) sont colorées en vert en A, en orange en B, et en jaune en C, respectivement, les hélices majeures étant indiquées. Les autres parties de la protéine sont colorées en gris dans les trois structures. L'hème, le CPI, et le bifonazole sont représentés sous forme de bâtonnets rouge, cyan et verts foncés, respectivement (Zhao, White et al. 2006)

1.2.6. Modélisation moléculaire

1.2.6.1. Construction de modèles structuraux par homologie et "amarrage"

Présentation : La modélisation par homologie utilise des structure connues de protéines, présentant plus de 30% d'identité de séquence avec la protéine de structure inconnue, comme base de construction d'un modèle structural pour cette protéine étudiée (Marti-Renom, Stuart et al. 2000).

Une des autres exploitations possibles d'un modèle moléculaire est la réalisation d'expériences appelée "d'amarrage" étudiant les interactions entre un P450 et son ligand, permettant de déterminer le positionnement le plus favorable d'un substrat dans le site actif par exemple.

Les modèles moléculaires ainsi construits apportent une somme d'information sur la structure de la protéine et ont été énormément utilisés lors de l'étude des P450s, surtout avant la cristallisation des structures de P450 mammifères. (Lewis, Dickins et al. 1998 ; Lewis, Dickins et al. 1999 ; Lewis, Dickins et al. 2003). Les modèles des P450s eucaryotes étaient alors construits par homologie avec les structures cristallographiques des P450s bactériens.

La construction d'un modèle, même s'il est toujours moins précis qu'une structure à haute résolution, permet en effet de se servir de celui-ci comme point de départ pour émettre des hypothèses qui seront ensuite validées expérimentalement grâce à la biochimie ou la mutagenèse.

Modèles du CYP2B6 : Le premier modèle par homologie du CYP2B6 était basé sur la structure du CYP102 bactérien (Lewis, Lake et al. 1999), puis la structure du CYP2C5 (50 % d'homologie avec le CYP2B6) ayant été résolue, celle-ci a été utilisée à son tour (Bathelt, Schmid et al. 2002 ; Lewis, Lake et al. 2002 ; Wang and Halpert 2002 ; Spatzenegger, Liu et al. 2003). Plus récemment, la structure du CYP2B4 (77% d'homologie avec le CYP2B6) a été utilisée comme référence (Lewis, Lake et al. 2006 ; Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) Dans deux de ces cas, le modèle a été utilisé en association avec des expériences de mutagenèse dirigée, avant (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) ou après (Spatzenegger, Liu et al. 2003) celles-ci.

Parfois, ces modèles ont également été utilisés lors d'expériences d'amarrage avec divers substrats. En compilant toutes les informations obtenues, il est possible de déduire que le site actif du CYP2B6 consiste en trois poches hydrophobes bien définies, adjacentes à l'hème. Ensuite, les résidus déterminés comme impliqués dans la spécificité de substrat dépendent de celui-ci.

Pour les médicaments anticancéreux cyclophosphamide (CPA) et ifosfamide (IFA) par exemple, il existe deux types de métabolisme possibles : une 4-hydroxylation ou une N-deethylation. La CPA est préférentiellement hydroxylée et l'IFA N-déethylée.

La construction d'un modèle du site actif du CYP2B6 et la comparaison de sa taille, de sa forme et de son hydrophobicité avec la forme des deux substrats (Bathelt, Schmid et al. 2002) ont amené à la conclusion que l'IFA et la CPA pouvaient se fixer de deux façons dans le site actif.

La différence entre la configuration préférée et l'autre est le remplissage des poches du site actif. La métabolisation préférentielle du substrat est en effet favorisée par le remplissage des trois poches du site, ce qui explique que lorsque les substrats se fixent en remplissant seulement deux poches (orientation non préférentielle), la catalyse soit moins efficace.

Le dernier modèle du CYP2B6 (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) a identifié les résidus Ile114, Val367, Val477 et Val478 comme étant en contact étroit avec la CPA lorsque celle-ci se trouvait dans le site actif. Des études de mutagenèse menées sur ces 4 acides aminés, remplacés par divers autres, parfois de types ou de tailles très différents, ont effectivement montré une modification positive ou négative des caractéristiques biochimiques par rapport à l'enzyme sauvage, confirmant leur implication dans des interactions avec le substrat.

Les modèles moléculaires ne permettent pas de déterminer exactement les mécanismes mis en jeu dans la reconnaissance du substrat par les P450s. En effet, ils ne peuvent séparer les aspects purement structuraux des aspects dynamiques impliqués dans les interactions avec les substrats. Mais ils apportent des renseignements supplémentaires et peuvent servir de base à des études de biochimie ou de mutagenèse permettant de valider, ou non, les théories émises à partir du modèle.

1.2.6.2. Canaux d'accès

1.2.6.2.1. Etudes dynamiques

Ces études sont parties du fait que le premier cristal de $P450_{cam}$ complexé avec son substrat favori, le camphre, a révélé de façon inattendue un site actif profondément enfoui au sein de la protéine, mettant en question les modalités d'accès du substrat au site actif (Poulos, Finzel et al. 1987). Aucun canal d'accès n'est en effet clairement visible dans les structures du $P450_{cam}$ complexé ou non avec son substrat.

Très tôt, il a été suggéré que l'hélice B', très flexible, permettrait par son déplacement l'entrée du substrat au site actif (Poulos, Finzel et al. 1987). Plusieurs études menées par d'autres groupes en utilisant la dynamique moléculaire (Ludemann, Lounnas et al. 2000 ; Ludemann, Lounnas et al. 2000) ou l'utilisation de cristaux du P450 complexé avec des substrats modifiés (Dunn, Dmochowski et al. 2001 ; Dunn, Hays et al. 2002) ont confirmé que les mouvements des hélices B', F et G et de la boucle F-G permettaient l'entrée du camphre dans le site actif.

En ce qui concerne les P450s de mammifères, l'analyse de la structure cristalline du CYP2C5 (Wester, Johnson et al. 2003) puis des études de dynamique moléculaire ont permis de mieux comprendre l'accès au site actifs de divers P450s (Winn, Ludemann et al. 2002 ; Scott, Liu et al. 2004 ; Wade, Winn et al. 2004 ; Schleinkofer, Sudarko et al. 2005).

En effet, la boucle F-G est beaucoup plus longue chez les eucaryotes et se structure généralement en deux petites hélices : F' et G. Cette région interagit beaucoup avec la région en feuillets β de la partie N-terminale, et probablement avec la membrane, limitant les possibilités d'ouverture évoquées pour les P450s solubles. Cependant, l'hélice B' reste encore très flexible et peut donc jouer un rôle dans l'ouverture d'un canal d'accès aux substrats.

1.2.6.2.2. Utilisation de CAVER

V.Cojocaru a publié récemment un article de recherche systématique de canaux (Cojocaru, Winn et al. 2007), effectuée sur diverses structures de la PDB, en utilisant le logiciel CAVER de détection de canaux (Figure 17). Il a ensuite fait le bilan de la détection de tous ces canaux et répertorié ceux déterminés par d'autres études publiées jusqu'à mars 2006, pour l'ensemble des P450s. Ceci lui a permis de déterminer l'existence de 13 types de canaux (Figure 18 et Tableau 1). Cette étude a souligné par la même occasion quelques différences entre les mécanismes d'entrée et de sortie entre les P450s bactériens et mammifères.

De nombreux canaux ont été détectés lors de l'observation de la protéine en mouvement, ce qui n'était pas le cas en utilisant les différentes structures cristallographiques obtenues. Ces travaux ont surtout montré une nouvelle fois l'exceptionnelle plasticité des P450s, capable d'adapter leur structure de façons très différentes pour l'entrée de substrats variés.

En conclusion, l'observation de nombreuses structures de P450s par diverses méthodes a permis de voir que celles-ci présentaient un repliement général plutôt proche, certaines caractéristiques étant inchangées. C'est un paradoxe par rapport à la variabilité des P450s observées par ailleurs. Ceci a mené à essayer de corréler certains paramètres structuraux à des caractéristiques de spécificité de substrat grâce à un éventail de méthodes.

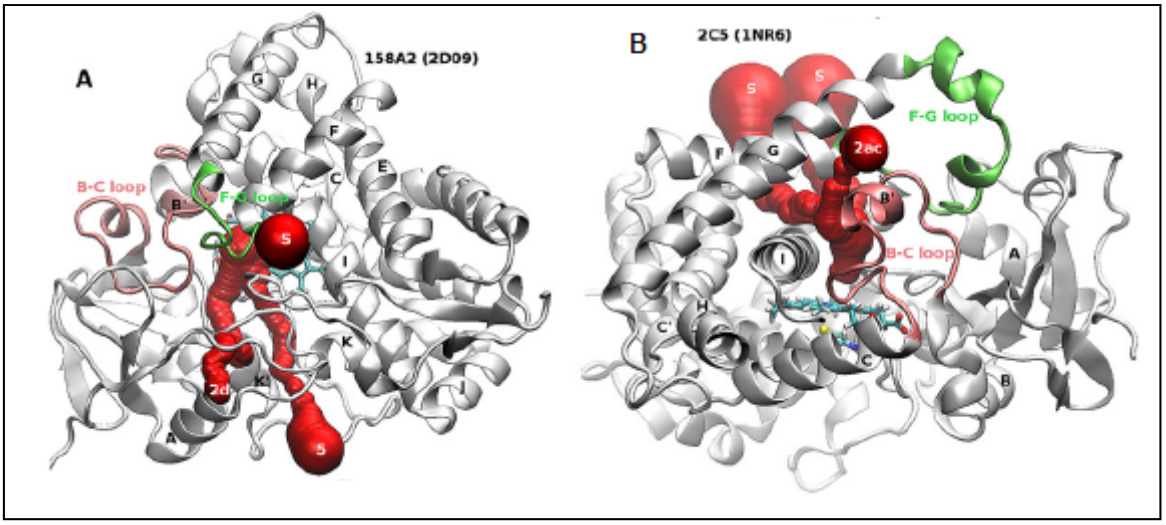


Figure 17. Exemples de topologies de différents P450 avec les canaux calculés par CAVER. Le P450 est représenté en gris. La boucle B-C est colorée en rose alors que la boucle F-G est en vert. Les hélices α sont annotées avec les lettres les désignant. L'hème est indiqué en bâtonnets cyan. Les liaisons Van der Waals des canaux potentiels sont représentés en rouge en utilisant le logiciel CAVER (A) CYP152A2 bactérien (réf. PDB 2D09), (B) CYP2C5 mammifère (réf. PDB 1NR6) (Cojocaru, Winn et al. 2007).

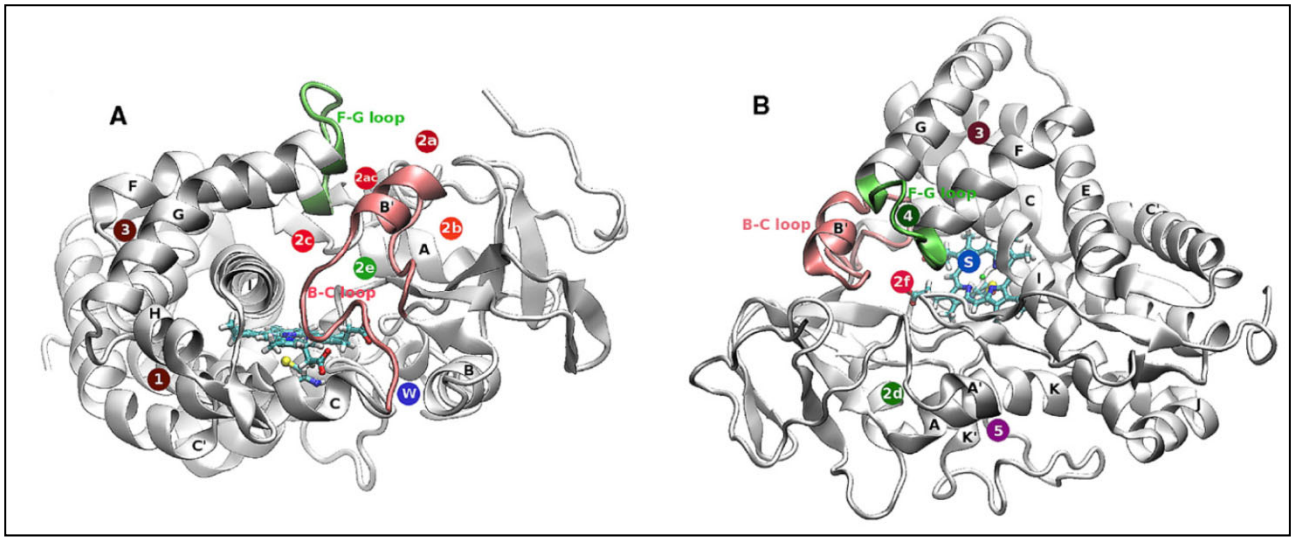


Figure 18. Canaux d'accès potentiels des P450s. Tous les canaux calculés ont été annotés sur la structure du $P450_{cam}$ (PDB 1ATKD). La protéine est représentée en gris avec les hélices (identifiées par leurs lettres respectives) en ruban et les feuillets en flèches. Les ouvertures des canaux sont indiquées par des cercles numérotés à la position correspondante, en surface de la protéine. Les canaux partageant une même couleur sont liés par (i) leur mode d'ouverture (2c, 2ac, 2a, 2f, 2b-en rouge ; 2c, 2d, 4-en vert ; 1,3-en marron) ; (ii) leur fonction [solvant (S), water (W)-en bleu] ; ou (iii) récemment identifié (5-violet). Chaque canal est indiqué avec une nuance de la couleur partagée. La boucle B-C est colorée en rose tandis que la boucle F-G est en vert. Deux vues distinctes sont représentées afin de montrer tous les canaux: (A) vue de profil, (B) vue de dessus (Cojocaru, Winn et al. 2007).

Tableau 1. Localisation et occurrence des canaux d'accès au site actif des P450s disponibles en Mars 2006 (Cojocaru, Winn et al. 2007). MD = dynamique moléculaire

Canal	*Localisation*	*Commentaires*	*Observé dans les P450*
1	Apparaît entre les hélices C/C' et H ou L, près de la boucle G-H et le feuillet 2	Canal rare, observé en MD. Possibilité de route pour les espèces gazeuses	$P450_{cam}$
2	Toutes les sous-classes exceptées 2d et 2f sont bordées par la boucle B-C/hélice B'. Cette région de la protéine est hautement variable à la fois en séquence et en structure entre les différents P450s. Elle est décrite comme importante pour la spécificité du substrat à travers les contacts qu'elle établit avec lui	-	-
2a	Apparaît entre la boucle F-G, l'hélice B'/boucle B-B'/boucle B-C et le feuillet 1. Toute cette région est extrêmement variable en séquence et en structure entre les différents P450s. La région C-terminale de l'hélice F forme le SRS-2 et la région N-terminale de l'hélice G forme le SRS-3	Canal commun	$P450_{BM3}$, CYP119, $P450_{st}$, $P450_{nor}$, CYP2B4, CYP2C9, $P450_{terp}$, CYP158A2, $P450_{OxyB}$, $P450_{OxyC}$, $P450_{epok}$, CYP175A1
2b	Apparaît entre la boucle B-B' et les feuillets 1 et 3, ce dernier contenant le SRS-5	Canal secondaire	$P450_{BM3}$, CYP2B4, CYP2C8, CYP3A4, CYP152A2
2c	Apparaît entre l'hélice G et I et l'hélice B'/boucle B-C. L'hélice I contient le SRS-4	Canal commun	CYP119, $P450_{nor}$, CYP2B4, CYP2C5, CYP2C8, CYP2C9, CYP154C1, CYP158A2
2ac	Apparaît entre le sommet de la boucle B-C (ou hélice B') et l'hélice G entre les canaux 2a et 2c	Canal commun	CYP119, $P450_{nor}$, CYP2B4, CYP2C5, CYP2C9, CYP154A1, CYP154C1, CYP158A2, $P450_{OxyB}$, CYP175A1
2e	Apparaît à travers la boucle B-C	Canal secondaire, il a été identifié comme une seconde sortie possible dans la MD du P450eryF	CYP2B4, CYP2C5, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP51, $P450_{EryF}$, CYP121, CYP152A2, CYP154C1, $P450_{OxyB}$, $P450_{epok}$
2d	Est spatialement proche du canal 2a d'où son appartenance à la sous-classe 2. Apparaît entre la région N-terminale du P450 et les hélices A et A'	Canal secondaire, surtout étudié pour le $P450_{BM3}$	CYP2B4, $P450_{BM3}$, CYP154C1
2f	Idem que le canal 2d pour la définition. Apparaît entre l'hélice F'.boucle F-G et le feuillet 5	Canal commun	CYP119, $P450_{nor}$, CYP2B4, CYP2C9, $P450_{cam}$, $P450_{BM3}$ $P450_{terp}$, CYP158A2, $P450_{OxyB}$, $P450_{OxyC}$, CYP175A1
3	Apparaît entre les hélices F et G ou au niveau de la boucle E-F	Canal rare, identifié comme une sortie secondaire potentielle du substrat ou du produit lors d'une MD du $P450_{cam}$	$P450_{cam}$
4	Apparaît au travers de la boucle F-G	Canal rare	CYP119, CYP2B4, CYP2C8
5	Apparaît entre les hélices K et K'	Canal rare	CYP2B4, CYP158A2, CYP175A1
S	Apparaît entre les hélices E, F et I et le feuillet 5	Présent dans la moitié des P450s, possibilité de sortie pour les substrats (non confirmé jusqu'à présent)	CYP119, $P450_{nor}$, CYP2B4, CYP2C5, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, $P450_{cam}$, $P450_{BM3}$, $P450_{terp}$, CYP158A2, $P450_{OxyB}$, $P450_{OxyC}$
W	Apparaît à la base de la boucle B-C, près de l'extrémité C-terminale de l'hélice B	Entrée de l'eau pour l'apport en oxygène moléculaire	$P450_{BM3}$

1.3. Relations structure – fonction

‘‘La Librairie de Babel,’’, une nouvelle de Jorge Luis Borges, décrit un univers infini sous la forme d’une librairie contenant tous les livres de 410 pages possibles dérivés d’un jeu de 25 caractères, apparemment arrangés de manière aléatoire (Ostermeier 2007). Le nombre de livres possibles étant fini, la librairie doit contenir des livres avec toutes les informations utiles possibles. Mais la majorité des livres ne contiennent que des phrases incompréhensibles et les livres semblent être distribués aléatoirement, rendant la librairie inutilisable. Cette librairie de Babel peut être utilisée comme une analogie de l’ampleur de l’espace des séquences protéiques et sa relation avec l’espace complexe des fonctions, paraissant contenir une certaine part de hasard.

En revanche, l’espace des protéines et la librairie présentent une différence fondamentale. De plus, les multiples combinaisons de séquence n'engendrent que des combinaisons de 20 acides aminés, ne pouvant se structurer qu'en 3 types de structures secondaires qui eux-mêmes se répartissent généralement en une petite combinaison de structures tertiaires. Et là où le contenu d’un livre de la librairie ne donne aucune information sur le livre se trouvant à côté, des séquences protéiques proches, et surtout des structures secondaires/tertiaires proches ont souvent tendance à présenter des fonctions proches. L’étude de la relation séquence-structure-fonction est donc plus simple que l’étude de la librairie de Borges, car cette relation est logique, même si nous sommes loin d’en comprendre toute la portée.

1.3.1. Présentation

Afin d’essayer d’obtenir quelques informations sur les relations structure-fonction, une des démarches la plus couramment utilisée est la modification d’une séquence corrélée à une fonction connue. L’observation du ou des changement(s) de fonction induits par ces modifications de séquence peut aider à comprendre la relation structure – fonction initiale, et comment la changer. Les P450s, notamment sont de très bon candidats à l’ingénierie dans une variété de desseins (Figure 19) (Gillam 2008).

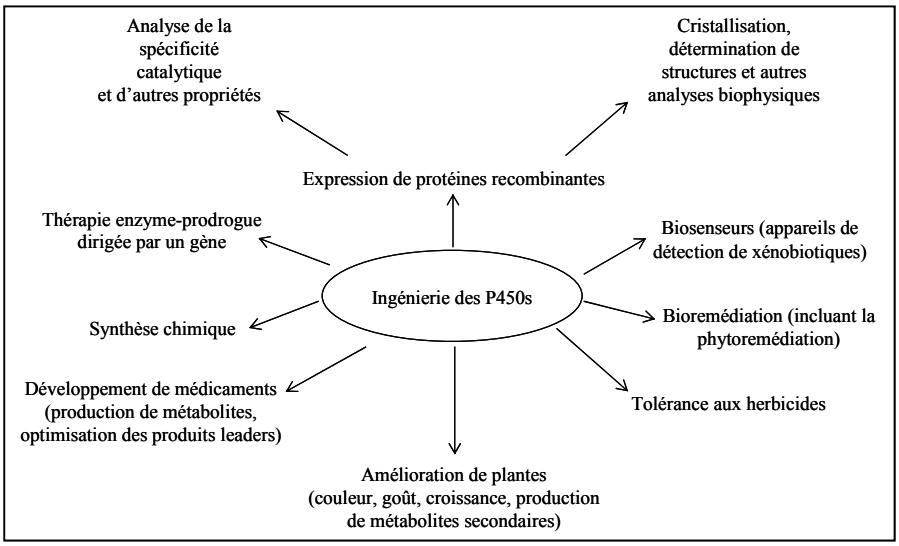


Figure 19. Domaines d’ingénierie du P450

Les principales applications de l'ingénierie des P450s ont été l'amélioration de l'expression hétérologue (Barnes, Arlotto et al. 1991 ; Hanna, Reed et al. 2000) et de la solubilité (pour l'obtention de structures) (Cosme and Johnson 2000), l'amélioration du transfert d'électrons en exploitant les cycles courts du P450 (Joo, Lin et al. 1999 ; Cirino and Arnold 2002) et enfin le changement ou l'amélioration de la spécificité de substrat. C'est ce domaine qui sera détaillé dans la partie suivante. De nombreuses méthodes de modifications de la séquence, plus ou moins rationnelles, ont été utilisées dans le cadre de ces deux approches d'étude et d'ingénierie des P450s.

1.3.2. Mutagenèse dirigée

Cette technique est basée sur l'observation que des modifications de quelques acides aminés (sur les 500 que comptent en moyenne les P450s) peuvent s'avérer critiques et changer la spécificité de substrat du P450 (Domanski and Halpert 2001). Ces techniques exigent par contre une bonne connaissance de base de la structure ou du mécanisme de la spécificité de substrat (Miles, Ost et al. 2000) afin de pouvoir cibler les résidus dont la mutation peut être informative. Pour les P450s bactériens, ceci est assez simple, des structures cristallines ayant été rapidement obtenues et leur expression étant simple (Gillam 2008). Pour les P450s eucaryotes par contre, ces informations sont souvent plus difficiles à obtenir et les premières mutagenèses dirigées sur des P450s de mammifère ont souvent exploité des résultats obtenus avec des P450s bactériens. Un autre point de départ possible pour la mutagenèse rationnelle a été la détermination des Substrate Recognition Sites par Gotoh. Il a été en effet prouvé que ces SRS jouaient un rôle important dans la reconnaissance des substrats, en accord avec des études à la fois antérieures de mutagenèse sur la famille 2 (Imai and Nakamura 1989; Lindberg and Negishi 1989) et postérieures pour des études de mutagenèse même d'autres familles (He, Luo et al. 1994 ; Roussel, Khan et al. 2000; Yun, Miller et al. 2000). Beaucoup de mutagenèses dirigées ont également été basées sur des informations existant pour d'autres isoformes de la même famille que le P450 étudié, ou encore des P450s métabolisant le même type de substrats. L'étude des variants alléliques naturels des enzymes peut aussi apporter beaucoup d'informations. Par ailleurs, ces techniques génèrent un nombre très restreint de mutants, et ont souvent pour but d'étudier le métabolisme d'un petit nombre de substrats. Ceci présente un côté pratique si la mesure de l'activité étudiée dépend d'un protocole long ou difficile à réaliser.

1.3.2.1. P450s bactériens

Un des premiers pas effectués dans la mutagenèse dirigée des P450s a été l'observation par Imai et coll. que la mutation d'un seul acide aminé, la thréonine 252, du $P450_{cam}$ (ou CYP101) pouvait provoquer un découplage du cycle catalytique du P450 vis-à-vis du camphre, son substrat préféré. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse de l'importance de la thréonine (en fait d'un groupement hydroxyl) à cette position de la protéine (Imai, Shimada et al. 1989).

Une autre étude de mutagenèse dirigée importante a également été menée sur ce P450 bactérien (Walsh, Kyritsis et al. 2000) et sur son métabolisme de déhalogénation de l'hexachloroethane et du pentachloroethane. Cette étude a déduit que les effets identiques de différentes mutations peuvent être additifs lorsqu'elles sont combinées. Les auteurs ont également observé que des mutations ayant des effets opposés sur la polarité du site actif étaient bénéfiques soit pour la liaison du substrat, soit pour l'activité catalytique. Il a donc était nécessaire de réaliser des compromis afin d'obtenir le meilleur résultat pour les deux caractéristiques.

Un autre P450 bactérien bien étudié, le $P450_{BM3}$ ou CYP102, a également été soumis à diverses études de mutagenèse dirigée, son autosuffisance au niveau du transfert d'électrons lui conférant un intérêt particulier. Une de celles-ci est l'analyse de la catalyse de substrats non naturels par ce P450. Les auteurs ont constaté que la mutation de certains résidus suffisait pour modifier complètement la stéréosélectivité très fine du CYP102 pour certains substrats, naturels ou exogènes (Li, Ogawa et al. 2001).

Une pléthore d'autres travaux de mutagenèse dirigée ont été effectués sur des P450s bactériens, surtout sur les CYP101 et 102 (revue Cirino and Arnold 2002 ; Gillam 2007). La majorité d'entre elles se sont focalisées sur le métabolisme de quelques substrats, permettant seulement de pointer des résidus impliqués dans la catalyse de certains types de substrat, les informations étant surtout apportées par les structures cristallines.

1.3.2.2. P450s mammifères

Comme pour les P450s bactériens, il a été prouvé très tôt qu'une seule mutation pouvait modifier fortement les propriétés biochimiques d'un P450 mammifère.

Par exemple, le remplacement de la thréonine 301, correspondant à la thréonine 252 du $P450_{cam}$, par les mêmes acides aminés dans le CYP2C2 (P450 laurate ω-1 hydroxylase) et le CYP2C14 (P450 testostérone 16-α hydroxylase), a des effets totalement différents pour les mêmes substrats. Cette mutation a également des effets sur des activités spécifiques à chaque P450. Ceci prouve qu'en s'appuyant sur des études préalables, la mutation d'un résidu par un autre peut changer l'activité de l'enzyme, et ce de différentes façons selon les substrats (Imai and Nakamura 1989).

D'autres travaux ont également été menés sur les P450s 2A4 et 2A5 de souris, ne différant que par 11 résidus. Ces P450s présentent des différences de spécificité de substrat : le CYP2A4 possède une activité testostérone 15α-hydroxylase et le CYP2A5 une activité coumarine hydroxylase. La modification d'un acide seul aminé du CYP2A5 par celui lui correspondant dans le CYP2A4 a permis de conférer au CYP2A5 une activité testostérone 15α-hydroxylase. La mutation inverse induit par contre une disparition quasi complète des deux activités du mutant, montrant qu'il n'y a pas de règles communes dirigeant les différentes spécificités de substrat (Lindberg and Negishi 1989).

Par ailleurs, la modification d'acides aminés du CYP2B1 basée sur un modèle structural généré grâce à la structure cristalline du CYP2C5 a également été réalisée.

Ici, c'est la régiosélectivité de l'hydroxylation de la progestérone qui a été étudié. En effet, le CYP2B1 hydroxyle avec une faible affinité l'hormone en C16α alors que le CYP2C5 hydroxyle avec une forte affinité la progestérone en C21. Initialement, neuf résidus du site actif du CYP2B1 (déduits grâce au modèle) ont été changés par ceux du CYP2C5 leur correspondant. Une additivité des effets des différentes mutations a été observé sur l'affinité ou l'activité 21-hydroxylase. Différentes mutations ont ensuite été ajoutées au fur et à mesure, aboutissant à un enzyme particulièrement performant et régiosélectif pour l'activité C21 progestérone hydroxylase (Kumar, Scott et al. 2003).

Toutes ces études s'appuyaient sur des modèles ou des études précédentes dont elles ont validé, au moins partiellement, les prédictions d'implication d'un ou plusieurs acides aminés dans la reconnaissance ou la spécificité de substrat. Mais ceci n'est pas tout le temps le cas.

Par exemple, la thréonine 319 du CYP1A2 de rat, correspondant à la thréonine conservée du CYP101, a été mutée en alanine. En se basant sur une étude précédente (Imai, Shimada et al. 1989), cette mutation avait une forte probabilité d'induire un découplage du cycle catalytique du P450 mutant. Or ce mutant T319A présente un couplage supérieur et une absence de production d'H_2O_2 lors de la métabolisation du méthanol (Hiroya, Ishigooka et al. 1992).

De plus, même si certains résidus situés dans les SRS semblent effectivement importants pour la reconnaissance du substrat des P450s, des études ont montré aussi l'importance de résidus non-SRS dans l'activité de l'enzyme. (Hsu, Griffin et al. 1993; Ibeanu, Ghanayem et al. 1996).

De nombreuses autres mutations ont été réalisées sur différents P450s de mammifère (Domanski and Halpert 2001) et là encore, il est difficile d'établir des relations claires entre la séquence et l'activité des P450s.

En résumé, la technique rationnelle de mutagenèse dirigée présente l'avantage d'être relativement rapide mais ne permet pas de définir une image globale de la relation structure-fonction, ne serait-ce même que dans une famille de gènes. Les mutations observées sont majoritairement spécifiques à un seul substrat ou un seul enzyme. C'est pour cela que les techniques d'évolution dirigée ont été développées, afin d'augmenter les informations recueillies en augmentant le nombre de mutants générés.

1.3.3. Evolution dirigée

La Nature a eu des millions d'années afin de modifier, par des cycles répétés de mutations et de sélection, les molécules du vivant pour accomplir des tâches hautement spécialisées (Arnold 2001). L'évolution dirigée (Figure 20), quant à elle, vise à reproduire *in vitro* et à l'échelle du temps du laboratoire, les mécanismes naturels ayant conduit à la diversification des molécules biologiques (Bloom, Meyer et al. 2005).

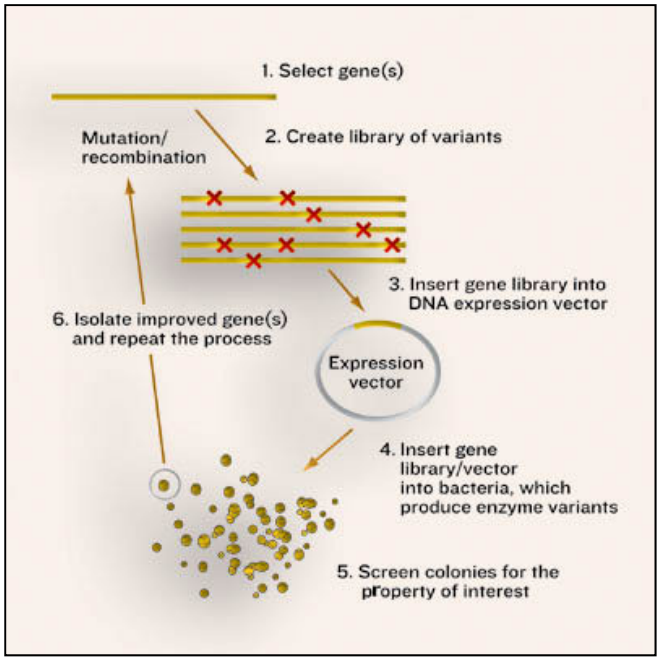


Figure 20. Schéma général du processus d'évolution dirigée. Une banque de variants (mutants ou gènes mosaïques) est créée. Après leur expression, certains variants sont sélectionnés selon l'objectif souhaité. Ceux-ci peuvent être soumis à de nouveaux cycles de création de diversité génétique, sélection et mélange de l'information génétique jusqu'à obtenir une variant possédant la fonction désirée (www.rsc.org).

En effet, contrairement au dessin rationnel de mutants, l'évolution dirigée ne nécessite pas d'avoir des informations préalables sur le mécanisme catalytique ou la structure de l'enzyme. Par contre, ce processus dépend de la disponibilité d'un crible à haut débit afin de sélectionner les mutants obtenus (Yuan, Kurek et al. 2005). Ces techniques d'évolution ont été appliquées, avec plus ou moins de succès, aux P450s afin d'améliorer leur activité vis-à-vis de certains de leurs substrats ou de leur faire métaboliser des substrats autres que les leurs, par exemple.

1.3.3.1. Mutagenèse aléatoire

Techniques : Si un crible efficace est validé pour la sélection des mutants, la PCR mutagène du gène cible (Figure 21) est une méthode relativement simple et rapide de génération de diversité. Il s'agit d'une PCR classique effectuée en présence de manganèse (Pritchard, Corne et al. 2005) ou d'un co-solvant organique, ce qui va déstabiliser la polymérase (Claveau, Sasseville et al. 2004). Une PCR avec des concentrations biaisées de dNTPs peut également être utilisée (Cadwell and Joyce 1994). Mais ces techniques ont tendance à générer des biais de mutations, dues à la nature de la polymérase utilisée. En effet, chaque polymérase présente des fréquences de mutation spontanée différentes et ont tendance à favoriser certaines transitions, comme par exemple de AT vers GC pour la Taq polymérase (Keohavong and Thilly 1989).

Afin de contourner ce problème, une autre approche aléatoire consiste en la mutagenèse à saturation (Figure 21), basée sur l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés pour introduire au niveau d'un codon ciblé un ensemble de nucléotides contenant les 64 codons possibles. Mais cette technique présente aussi des biais liés à la nature redondante du code génétique (Abecassis, Urban et al. 2003).

Alternativement, la méthode SeSaM (pour sequence saturation mutagenesis) utilise la base "universelle", la deoxyinosine, incorporée tout au long de la séquence et qui peut ensuite être remplacée par n'importe quel nucléotide (Wong, Tee et al. 2004).

Applications : Un exemple de PCR mutagène appliqué aux P450s est la mutagenèse à saturation qui a été effectuée sur les SRS du CYP1A2 (Parikh, Josephy et al. 1999). Après un premier tour de mutagenèse, six banques différentes (une pour chaque SRS) totalisant 6000 mutants ont été criblées en utilisant un test colorimétrique d'activation du 3,5-dimethylimidazole[4,5-f]quinoline (MeIQ). Vingt-sept mutants sélectionnés par ce crible ont ensuite été testés pour leur activité sur trois substrats dans un test *in vitro*. Ces tests ont généré un grand nombre d'informations présentées dans la Figure 22.

Les profils des mutants varient considérablement pour les trois réactions mais il est possible d'extraire quelques informations. En effet, tous les mutants F226 présentent une activité réduite pour tous les substrats alors que les mutants E225 présentent des activités augmentées. Par contre les effets observés des mutations sont difficilement explicables, contredisant parfois des études précédemment réalisées. La structure du 1A2 n'étant pas connue à l'époque, l'interprétation des résultats restait très hypothétique.

Ces travaux montrent que les résidus ou les combinaisons de résidus à cibler pour modifier l'activité des cytochromes P450 sont difficilement prédictibles mais que, par contre, ils sont accessibles à l'évolution dirigée.

1.3.3.2. PCR sexuelle

Techniques : Le but de la PCR sexuelle (ou DNA shuffling en anglais) est de rassembler des fragments de différents gènes dans une seule molécule d'ADN, recombinant ainsi l'information génétique source pour former de nouvelles séquences. Cette approche consiste dans un premier temps à choisir le(s) gène(s) de départ : il peut s'agir d'un gène unique (non détaillé dans ce mémoire) (Crameri, Whitehorn et al. 1996), ou d'un ensemble de variants ayant accumulé différentes mutations (suite à des étapes de mutagenèse dirigée ou aléatoire (Stemmer 1994), ou encore d'une famille de gènes (Crameri, Raillard et al. 1998), dans ce cas on parle de PCR sexuelle familiale. Ce type de méthode exige également l'existence d'un crible performant afin de pouvoir sélectionner les variants générés.

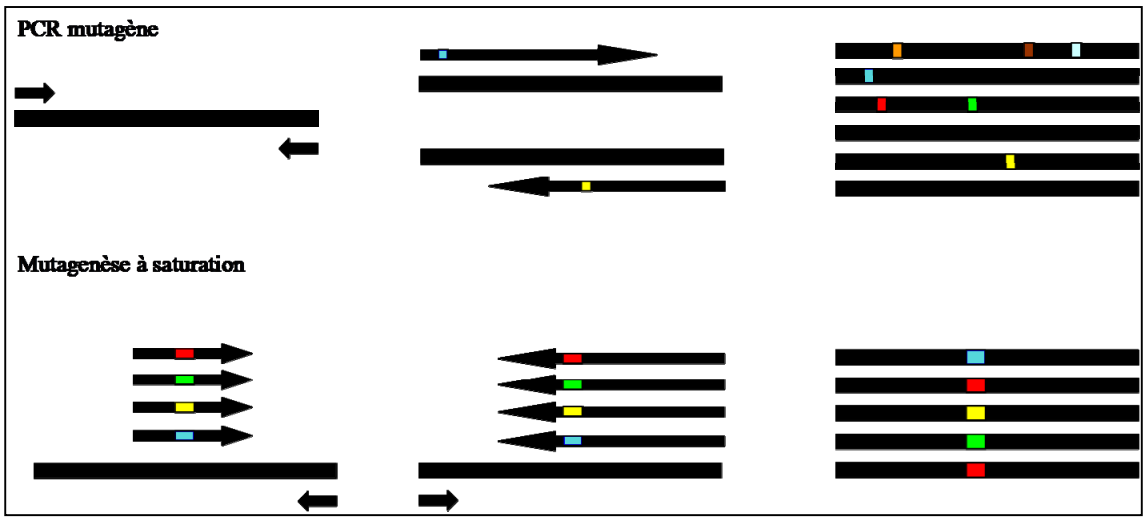


Figure 21. Représentation schématique de techniques de mutagenèse aléatoire (http://openwetware.org/wiki/Reviews/Directed_evolution/Library_construction)

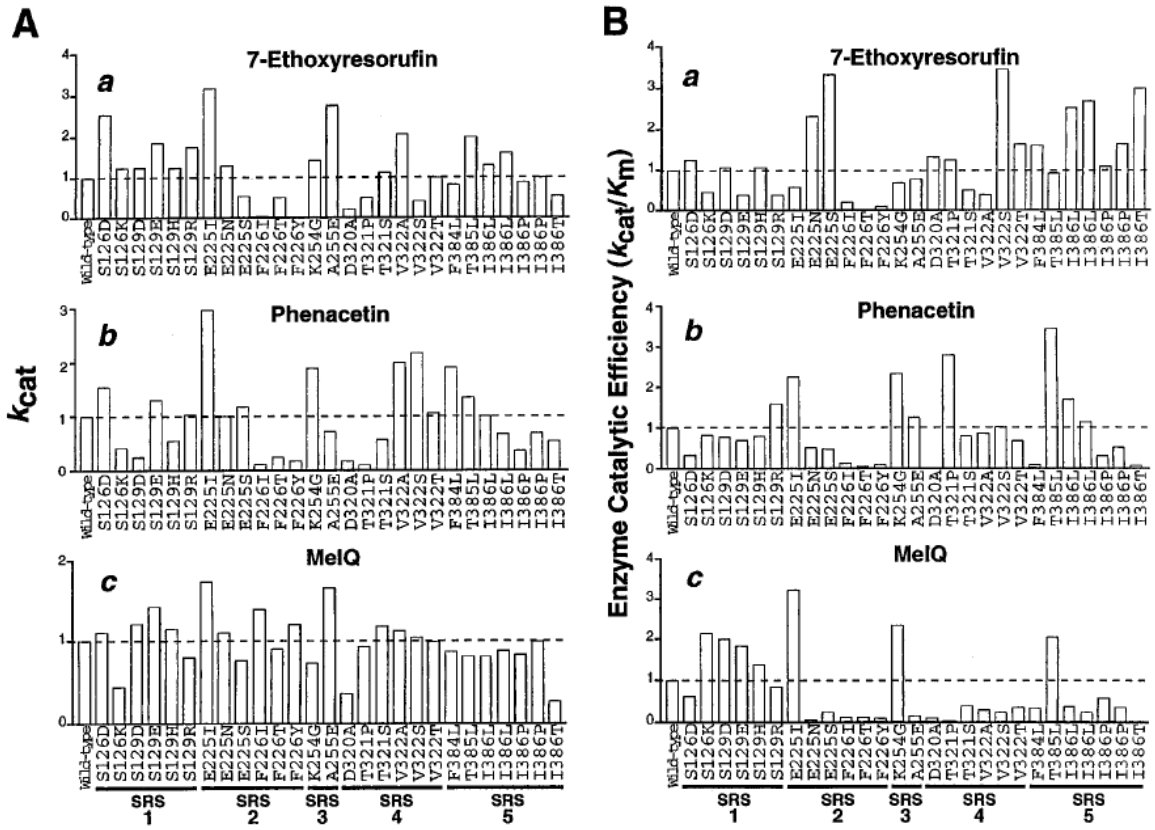


Figure 22. Comparaison du k_{cat} et du k_{cat}/K_m du CYP1A2 sauvage et des 27 mutants du CYP1A2 pour 3 substrats (Parikh, Josephy et al. 1999).

Applications de la PCR sexuelle familiale : une des premières expériences réalisés en utilisant le DNA shuffling a utilisé la capacité intrinsèque de la levure à effectuer de la recombinaison homologue (Orr-Weaver and Szostak 1983). Le CYP1A1 et 1A2 de souris ont ainsi été recombinés, générant des chimères bi ou tripartites. Cette étude a permis de formuler l'hypothèse que certains fragments des P450s jouaient un rôle déterminant dans la spécificité de substrat, ces fragments étant différents selon les substrats (Pompon and Nicolas 1989).

Toujours pour les P450s 1A1 et 1A2, mais humains cette fois, une autre technique, appelée CLERY, a également été testée (Abecassis, Pompon et al. 2000). Après identification des mutants non parentaux fonctionnels par divers cribles dans la levure, cette banque a ensuite été caractérisée de façon plus approfondie en évaluant l'activité des clones pour quatre substrats différents (Abecassis, Urban et al. 2003) pour lesquels les mutants se sont révélés catalytiquement divers. Des études de corrélation entre deux substrats montrent l'émergence d'un groupe de mutants qui ne présentent les caractéristiques ni du 1A2, ni du 1A1, formant une nouvelle classe d'enzymes. Cette étude expose également des résultats de tests fonctionnels réalisés sur des mutants générés par une mutagenèse à saturation sur un fragment du CYP1A1 qui avait été déduit de l'étude de Pompon et Nicolas (Pompon and Nicolas 1989). Tous les mutants soumis à des tests de corrélation avec différents substrats présentaient une spécificité de substrat similaire à un des deux parents. Ceci permet de déduire que la stratégie basée sur la recombinaison semble générer une plus grande diversité que la stratégie basée sur la mutagenèse à saturation, concentrée sur un fragment.

Une autre étude a montré la possibilité d'introduire une activité dans une protéine par chimérogenèse. Une protéine hybride entre le CYP2C2 et le CYP2C14 présente une activité qui est absente des protéines parentales. De plus, cette protéine hybride présente des activités d'hydroxylation supérieures pour des substrats métabolisés par les protéines parentales (Uno and Imai 1992).

Huang et al ont généré des mutants par DNA family shuffling pour la famille 2C (Huang, Johnston et al. 2007). Une banque de chimères a été réalisée à partir des CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 et du CYP2C19. La diversité fonctionnelle de la banque a été étudiée dans deux systèmes de tri, *E.coli* et *in vitro,* en utilisant cinq substrats pour lesquels les enzymes parentaux présentent des spécificités différentes. Une fois encore, ce type d'approche a permis d'obtenir des mutants présentant des spécificités de substrat différentes de celles des enzymes parentaux. De plus, la banque dont ils sont issus présente un taux relativement élevé de mutants fonctionnels. Cette étude montre aussi comment le choix d'un système de criblage peut influer sur les résultats obtenus.

La PCR sexuelle familiale permet d'explorer un grand espace de séquences tout en conservant un repliement structural relativement fonctionnel, ce qui permet d'obtenir quelques informations globales sur les relations structure-fonction (Carbone and Arnold 2007). Par contre, les points de jonction induits par la recombinaison peuvent séparer des acides aminés qui interagissaient dans les protéines parentales, induisant ainsi des pertes de fonctionnalité. Ceci est d'autant plus important que les protéines que l'on veut recombiner

présentent de faibles taux d'identités. Il a ainsi été observé que la recombinaison aléatoire de séquences présentant moins de 70% d'identité générait une majorité de mutants non fonctionnels (Ostermeier, Shim et al. 1999 ; Lutz, Ostermeier et al. 2001).

1.3.4. Combinaison de méthodes

La combinaison de différentes méthodes de génération de diversité peut s'avérer utile pour obtenir un meilleur résultat final. Il peut s'agir de potentialiser l'effet des meilleurs mutants obtenus au cours d'un processus de mutagenèse aléatoire ou encore d'appliquer un processus d'évolution rationnelle sur un premier jeu de mutants déjà sélectionnés par une méthode d'évolution dirigée.

Par exemple, le CYP102 sauvage, qui métabolise des acides gras, a été muté en un P450 qui catalyse efficacement la conversion d'alcanes en alcools. Pour cette expérience, les auteurs ont soumis le CYP102 à deux premiers cycles de mutagenèse aléatoire suivis de cycles de recombinaison des meilleurs mutants par une méthode appelée StEP (Staggered Extension Process (Zhao, Giver et al. 1998)), chaque cycle de mutation étant séparé par une étape de tri. Une combinaison de différents cribles a été utilisée pour sélectionner les mutants. Après cinq générations, les auteurs ont obtenu un mutant hydroxylant différents alcanes courts et des acides gras avec des turnovers (TN) plus élevés que pour la forme sauvage. Les mutations observées étaient inattendues par rapport aux études précédemment réalisées sur le CYP102, de plus une seule des mutations du variant final était réellement en contact avec le substrat (Glieder, Farinas et al. 2002).

D'autres auteurs ont soumis le CYP2B1 à un processus d'évolution dirigée après une première étude par mutagenèse dirigée (Kumar, Scott et al. 2003). Pour le criblage à haut débit, deux systèmes utilisant un substrat fluorescent ont été développés dans la bactérie. Le mutant initial a été soumis à deux tours de mutagenèse aléatoire suivis à nouveau d'une mutagenèse dirigée. Ceci a permis l'obtention de mutants améliorés pour un jeu de substrats et d'identifier des résidus importants pour l'activité hors du site actif.

En conclusion, les méthodes d'évolution dirigée se révèlent utiles pour la génération d'une diversité importante, permettant d'obtenir plus facilement des spécificités de substrat modifiées par rapport à l'enzyme ou aux enzyme natif(s). L'espace des séquences étudiées est beaucoup plus large et permet de déterminer le rôle de résidus situés en dehors des sites considérés comme importants dans le métabolisme du substrat, apportant parfois des informations sur les relations structure-fonction de la protéine (Gillam 2008). Mais ces techniques exigent un crible fonctionnel à haut débit, pas toujours disponible, afin de pouvoir trier un nombre de mutants fonctionnels suffisant pour obtenir des résultats intéressants. De plus, ces approches, générant des chimères avec un grand nombre de mutations, ne permettent pas de déterminer la contribution exacte de chacune de ces mutations au changement de spécificité de substrat, fournissant finalement des informations peu réutilisables dans le cadre d'autres études.

1.4. Rationalisation des approches d'étude de la relation structure – fonction

Parmi les méthodes de mutagenèse rationnelle ou d'évolution dirigée, aucune n'est universelle, ce qui a mené les chercheurs à essayer de combiner les avantages des deux types d'approches. Le but est d'arriver à générer des banques de mutants plus contrôlées pour leur diversité et leur fonctionnalité et à interpréter au mieux la quantité de données générée par l'étude de ces banques. Ces techniques reposent sur le développement de la bioinformatique et son application aux calculs statistiques. Ces approches peuvent également posséder un certain côté prédictif pour l'étude des relations structure-fonction

1.4.1. Algorithmes de décision

Ces algorithmes permettent à l'expérimentateur de choisir de façon beaucoup plus fine la méthode de génération de banque qu'il peut utiliser et ceci sans informations préalables nécessaires. Ces approches permettent la génération de banques de haute qualité, présentant à la fois un bon taux de diversité et de fonctionnalité des mutants.

1.4.1.1. Mutagenesis Assistant Program (MAP)

Cet algorithme est basé sur le constat que les méthodes actuelles de mutagenèse présentent certains défauts tels que la génération de codons stop et d'acides aminés déstabilisant la structure protéique et un faible nombre moyen de substitutions en acide aminé par résidu (Wong, Roccatano et al. 2006). Les auteurs relèvent aussi le fait qu'une méthode de mutagenèse non biaisée avec une substitution unique de nucléotides par codon possède une efficacité limitée due à l'organisation du code génétique et est loin d'être chimiquement diverse (propriétés des acides aminés). Afin de remédier à ces problèmes, les auteurs ont compilé dans l'algorithme MAP les informations sur les différents paramètres de diversité de séquence qui peuvent être obtenue par 19 techniques de mutagenèse différentes. Cet algorithme repose sur trois indicateurs : un indicateur de structure protéique (détection de mutations générant des mutants tronqués ou non fonctionnels), un indicateur de diversité d'acides aminés avec un coefficient de diversité de codons (afin d'éviter les biais de mutagenèse) et un indicateur de diversité chimique (pour augmenter les divers types chimiques - aliphatiques, aromatiques, neutres et chargés - d'acides aminés représentés). Une analyse MAP pour une substitution unique de nucléotide a été appliqué à quatre gènes : celui du CYP102 ($P450_{BM3}$), celui d'une glucose oxydase fongique, celui d'une arylestérase bactérienne et celui d'une alcool déshydrogénase de levure. A partir des 19 méthodes étudiées, les critères pour une mutagenèse idéale ont été proposés (Wong, Roccatano et al. 2006).

1.4.1.2. SCHEMA

Présentation : Cet algorithme SCHEMA a été proposé par l'équipe d'Arnold (Voigt, Martinez et al. 2002 ; Meyer, Silberg et al. 2003 ; Endelman, Silberg et al. 2004; Silberg, Endelman et al. 2004). Celui-ci permet d'enrichir les banques de chimères générées par recombinaison, en protéines correctement repliées tout en maintenant un niveau approprié de diversité pour l'évolution. L'algorithme est basé sur l'identification de fragments de protéines, ou schémas, qui peuvent être recombinés entre eux sans modifier l'intégrité de la structure 3D. En effet, l'algorithme évalue la disruption causée lorsque des résidus d'un réseau d'acides aminés interagissant dans la structure 3D d'une ou des protéine(s) parentale(s) sont hérités de deux parents différents dans un mutant, après une recombinaison. Pour un jeu donné de parents, l'algorithme sélectionne les points de recombinaison qui minimisent l'énergie moyenne, sujette à des contraintes sur la longueur de chaque fragment ou schéma. Lorsque la recombinaison ne modifie pas ces schémas, les protéines générées présentent une plus forte probabilité d'être repliées et fonctionnelles (Voigt, Martinez et al. 2002 ; Meyer, Silberg et al. 2003 ; Endelman, Silberg et al. 2004; Silberg, Endelman et al. 2004).

Applications : Cet algorithme a d'abord été appliqué à la construction de banques de beta-lactamases partageant une identité de séquence de 40% (Hiraga and Arnold 2003). Ceci a démontré qu'une protéine hybride possédait un seuil pour le nombre de disruption des schémas qu'elle peut tolérer. Le séquençage des gènes sélectionnés a révélé que le pourcentage de clones fonctionnels diminuait de façon exponentielle en fonction de l'augmentation de la disruption calculée E (le paramètre E traduit le nombre de contacts inter-résidus qui sont détruits lors de la recombinaison) Cette étude a également montré que les chimères avec un E bas avait une plus forte probabilité d'être fonctionnelles que les chimères avec le même niveau de mutation mais choisies de manière aléatoire dans la banque. De plus, les points de recombinaison trouvés en criblant des banques de protéines recombinées de façon aléatoire afin de trouver des mutants fonctionnels sont fortement corrélés à ceux prédits par SCHEMA (Hiraga and Arnold 2003).

SCHEMA a aussi été utilisé pour la construction de banques de deux ou trois CYP102 (Otey, Silberg et al. 2004 ; Otey, Landwehr et al. 2006; Landwehr, Carbone et al. 2007) où, là encore, la corrélation entre la valeur E et la fonctionnalité/activité des mutants a été vérifiée (Tableau 2). Les séquences chimériques obtenues, en grande majorité fonctionnelles et repliées, présentaient soit des capacités fonctionnelles caractéristiques des protéines parentales soit des fonctions totalement nouvelles. Un alignement de séquences de 955 chimères de ces banques, repliées ou non, représente une source d'informations importante pour l'étude des relations séquence-structure-fonction. Des analyses statistiques de cet alignement ont permis d'identifier les contributions structurales clés pour l'incorporation de l'hème et l'activité peroxygénase. Des possibles différences structurales entre les deux parents CYP102A1 et CYP102A2 ont été également suggérées.

Tableau 2. Caractéristiques des mutants de CYP102A1 et CYP102A2 obtenus après analyse des structures par l'algorithme SCHEMA (Otey, Silberg et al. 2004).

Table 1. Properties of Designed CYP102A1-CYP102A2 Chimeric P450s

Protein[a]	*E* (Substrate Bound)[b]	*E* (Substrate-Free)[b]	*m*[c]	Folded (λ max)[d]	T_m (°C)	Peroxidase Activity[e]
CYP102A1-h	–	–	–	yes (448)	55	2.6 ± 0.1
CYP102A2-h	–	–	–	yes (449)	44	0.4 ± 0.1
364–403	2	2	13	yes (449)	51	1 ± 0.2
165–256	7	7	36	yes (449)	48	16.1 ± 1.4
165–256M	[7]	[7]	36	yes (448)	50	3.5 ± 0.4
285–341	10	9	19	yes (448)	53	2.1 ± 0.1
191–335	12	12	50	yes (449)	40	N.D.
169–197	12	10	11	yes (449)	52	100.3 ± 3.1
169–197M	[12]	[10]	11	yes (449)	43	0.3 ± 0.1
65–256	15	13	61	yes (447)	36	N.D.
118–194	20	19	20	yes (449)	47	34.3 ± 1.2
70–299	21	19	70	yes (448)	42	0.8 ± 0.3
46–73	27	30	16	yes (448)	55	6.8 ± 0.5
277–365	27	28	33	yes (421)	39	N.D.
43–135	34	38	33	yes (448)	53	6.8 ± 0.4
196–365	34	35	65	no	–	N.D.
196–365M	[34]	[35]	65	no	–	N.D.
50–140	38	39	32	yes (448)	52	10.4 ± 0.6
345–448	42	43	34	no	–	N.D.

[a] CYP102A1-h and CYP102A2-h refer to the isolated heme domains of CYP102A1 (with the F87A substitution) and CYP102A2 (with the F88A substitution). Chimera names correspond to the first and last residue of CYP102A2-h inserted into CYP102A1-h according to the numbering of CYP102A1. "M" indicates mirror chimeras where CYP102A1-h is inserted into CYP102A2-h.
[b] SCHEMA-calculated disruption (see Experimental Procedures) based on substrate bound (1JPZ) and substrate-free structures (2HPD). Brackets indicate assumed disruption for mirror chimeras (due to lack of crystal structure of CYP102A2).
[c] Effective level of mutation (= amino acid Hamming distance to closest parent).
[d] Folding as assayed by reduced CO difference spectroscopy. λmax for Soret band is reported.
[e] Values reported in nmol product/nmol P450/min. Activities < 0.2 were not detectable (N.D.).

SCHEMA représente un outil *a priori* puissant pour l'étude de l'évolution fonctionnelle au sein du schéma structural des P450s. De plus, des protéines possédant un bas taux d'homologie peuvent également être recombinées car la proportion de mutants non fonctionnels est diminuée de beaucoup lors de l'utilisation de l'algorithme. Ceci peut être très utile pour les P450s qui présentent parfois des identités de séquence très basses mais qui sont de bons candidats pour la recombinaison car ils possèdent des spécificités de substrats différentes, permettant de modifier l'activité d'un des parents ou de créer de nouvelles activités. Mais pour cette méthode, il est nécessaire de posséder des informations préalables de structure (au moins un modèle) afin de calculer la valeur de E.

Ces algorithmes permettent une réelle facilitation de la construction de banques comprenant une bonne quantité d'enzymes fonctionnels et donc très informatives par rapport à des banques construites de manière complètement aléatoire.

1.4.2. Utilisation d'approches statistiques multivariées

1.4.2.1. Principe

Ces approches sont basées sur l'analyse de matrices d'activités d'une banque d'enzymes (qui peut être une banque de mutants) vis-à-vis d'une banque de substrats. L'application de fonctions statistiques tels que l'analyse en composantes principales (PCA), le positionnement multidimensionnel (MDS) ou l'algorithme k-means permet d'interpréter la similarité ou la

différence des données parentales et/ou mutantes issues d'une matrice et aussi de les représenter le plus fidèlement possible sous forme de groupes dans un espace à faible dimension (Urban, Truan et al. 2008). La seule exigence de ces techniques est que les banques d'enzyme et de substrats doivent posséder des structures combinatoires construites à partir d'un petit nombre de modules structuraux. Ceci permet d'évaluer de manière globale les relations structure - fonction en profitant de l'exploration approfondie de l'espace des structures et des fonctions via le grand nombre d'échantillons analysés.

1.4.2.2. Applications

Ce type de calculs a été appliqué à deux banques de P450s mutants du 1A1 et du 1A2 générées par mutagenèse à saturation ou par CLERY et criblées contre une petite banque de substrats fluorescents (Taly, Urban et al. 2007) ou une large banque de composés hydrocarbures aromatiques polycycliques et de 3 substrats fluorescents (Urban, Truan et al. 2008). Cette étude a permis de discriminer les différentes spécificités de substrats des divers mutants, leur proximité par rapport aux parents et a permis de déterminer un fragment de séquence contrôlant le glissement d'une discrimination de substrat de type 1A1 vers une discrimination de type 1A2 pour les 3 substrats.

Deux autres applications des approches statistiques ont été effectuées dans le cadre d'une banque de mutants de CYP102 construites à partir de l'algorithme SCHEMA. La première a été exposée au paragraphe précédent (Otey, Landwehr et al. 2006). Pour la deuxième, les activités des mutants du CYP102 ont été criblées avec 11 substrats de tailles et de natures diverses (Landwehr, Carbone et al. 2007). Des corrélations deux à deux ont été appliquées aux différentes activités mesurées et il a été montré que les 11 substrats se classifiaient en 4 classes indépendantes, ce qui réduit le nombre de substrats à tester contre une banque de variants.

L'équipe de Mannervik, quant à elle, a appliqué les techniques de statistiques multivariées à des enzymes glutathion transférases (GST) obtenues par évolution dirigée. Afin de sélectionner des variants, issus du premier tour de mutations entre deux GSTs, qui seraient utilisés comme parents dans le tour suivant, une analyse statistique a été utilisée pour étudier la matrice d'activités obtenues à partir de centaines de variants GST criblés contre une banque de six substrats (Larsson, Emren et al. 2004). Les valeurs d'activités sont ensuite groupées en 4 classes regroupées autour de 4 centres, ceci sur la base de leur proximité dans l'espace substrat - activité à six dimensions. Quel que soit le nombre de classes définies lors du calcul de l'algorithme (de 4 à 15), un des mutant (point bleu sur la Figure 23) était séparé de tous les autres et cinq autres (points rouges sur la Figure 23) étaient groupés ensemble. Les autres mutants représentés par des points verts et jaunes sur la Figure 23 étaient répartis dans des sous-classes supplémentaires lorsque le nombre de classes définies lors du calcul augmentait. Le mutant isolé (point bleu) présente uniquement une activité EPNP (1,2-epoxy-3-(4-nitrophenoxy)propane) beaucoup plus élevée que tous les autres mutants.

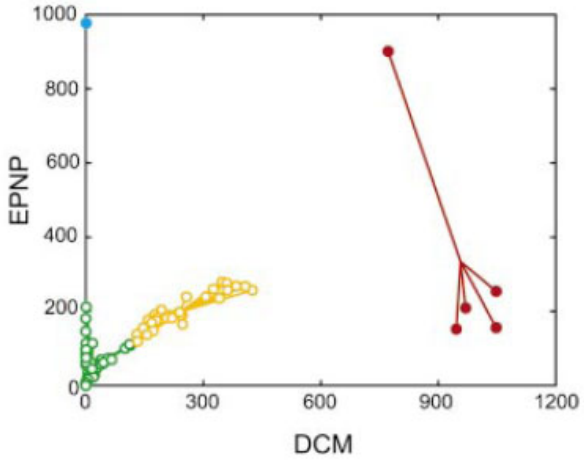


Figure 23. Analyse par l'algorithme k-means de mutants de GST de la première génération. (Larsson, Emren et al. 2004)

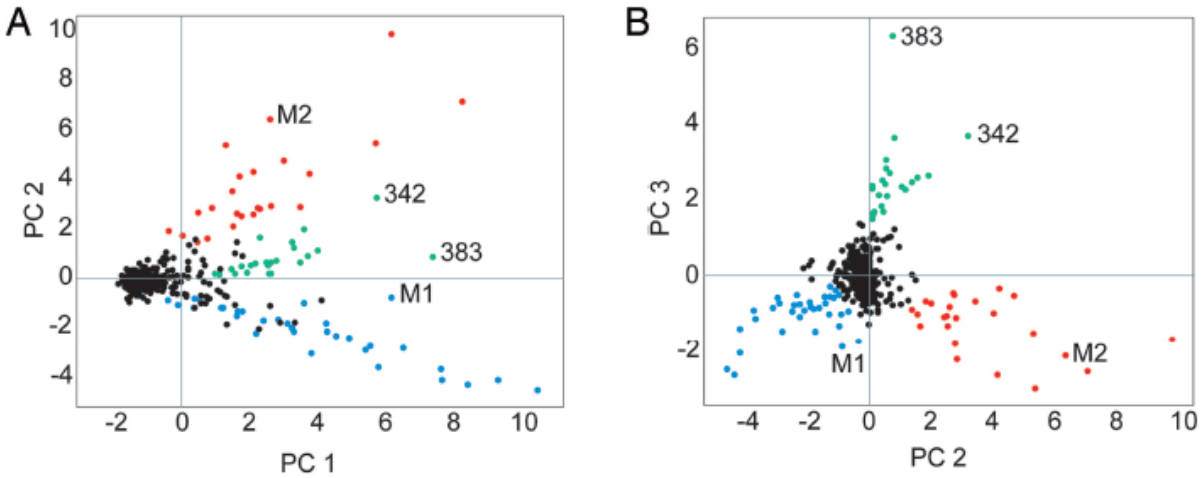


Figure 24. Distribution sur un diagramme en composantes principales des 384 variants issus de la recombinaison de deux GST M1 et M2. (A) Distribution observée sur un diagramme prenant en compte les deux composantes principales PC1 et PC2, PC1 représentant l'activité "générale" des mutants par rapport aux substrats et PC2 la spécificité de substrats de chacun des parents. (B) Distribution observée sur un diagramme prenant en compte les deux composantes principales PC2 et PC3, PC3 représentant des activités observées sur des substrats très peu métabolisés par les enzymes parentaux. (Emren, Kurtovic et al. 2006)

Les cinq mutants groupés (points rouges) sont caractérisés par une forte activité DCM (dichlorométhane) et EPNP. Ils possèdent tous la même mutation d'une cystéine en sérine en position 14, qu'aucun des autres mutants ne possèdent et ils ont été utilisés comme base pour un deuxième tour de mutagenèse par recombinaison (Larsson, Emren et al. 2004), générant un enzyme grandement amélioré. Ceci montre comment l'analyse multivariée peut guider l'évolution dirigée vers des résultats fructueux.

Dans une autre étude (Emren, Kurtovic et al. 2006), le jeu de données cinétiques a été obtenu à partir de l'analyse des activités de 384 variants aléatoires de GST issus de la recombinaison de deux GST humaines M1 et M2 (84% d'identité) pour huit substrats. Lors de l'analyse en composantes principales, tous les variants se regroupaient à l'intérieur de quatre distributions différentes (Figure 24) : une pour les enzymes non fonctionnels (en noir), une pour chaque enzyme parental et les mutants groupant avec eux (en bleu le parent M1, en rouge pour le parent M2) tandis que le quatrième groupe contenait uniquement des variants évolués (en vert), présentant des activités différentes de celles des parents. Ceci montre que les variants de GST forme une entité évolutive qui présente une nouvelle spécificité de substrat pour les huit substrats considérés, qui n'est ni de type M1, ni de type M2. Cette nouvelle entité a été nommée "quasi-espèce". De telles sous-populations divergentes ne peuvent être identifiées que par des outils statistiques multivariés. La recherche de "quasi-espèces" est donc une étape nécessaire afin de révéler de nouvelles propriétés fonctionnelles. Kurtovic et coll. ont nommé cette nouvelle approche "l'exploration multivariée d'activité" (Kurtovic, Runarsdottir et al. 2007).

Ce type d'approche statistique promet d'être utilisé à l'avenir car elles permettent de dégager de manière claire des mécanismes structuraux et fonctionnels communs à plusieurs enzymes. Ceci apporte une certaine valeur prédictive à ces méthodes dans l'ingénierie protéique et la construction de banques par évolution dirigée. Leur inconvénient majeur est la somme d'expériences à réaliser afin d'obtenir un jeu de données suffisants pour être informatif.

1.4.3. Nouvelles méthodes de modélisation

Les outils bioinformatiques de modélisation par homologie ont été beaucoup utilisés depuis leur développement afin de pallier à un manque de connaissances structurales mais ils peuvent également être utilisés pour d'autres applications.

1.4.3.1. Blocs Structuraux Conservés

Un premier exemple est la mise à profit du repliement unique des P450s pour réaliser un alignement, non pas de séquences, mais d'éléments structuraux de diverses structures de référence par un outil bioinformatique (Jean, Pothier et al. 1997 ; Nguyen 2007). Ceci permettrait de définir des zones fixes de structure n'étant pas limitées aux éléments de structure secondaire et appelés Blocs Structuraux Conservés (CSB).

Les CSB sont ensuite utilisés pour être alignés avec la séquence du P450 à modéliser. Les zones variables seront quant à elles construites sans informations structurales *a priori*. Ainsi cette méthode s'affranchit de l'utilisation d'une structure unique de référence, évitant d'obtenir un modèle trop proche des matrices structurales initiales et permet aussi de fournir un alignement en séquence plus fiable. De plus, les CSB peuvent également être utilisés comme "signatures" structurales afin d'identifier la nature de certaines protéines séquencées mais orphelines de fonction.

1.4.3.2. Protéines artificielles

Le pas suivant de l'utilisation de la bioinformatique a été effectué lors de deux études reliées entre elles (Russ, Lowery et al. 2005; Socolich, Lockless et al. 2005) pour la construction uniquement par ordinateur de séquences protéiques artificielles en utilisant seulement des alignements de séquences multiples et sans aucune information structurale. Partant du principe que la structure est basée sur la séquence primaire, les auteurs ont essayé de définir les règles de séquences qui spécifient un repliement protéique (ici un petit domaine protéique répandu appelé WW). L'étude expérimentale des banques de séquences de domaines WW artificiels montre qu'une simple fonction statistique d'énergie prenant en compte la coévolution de résidus était nécessaire et suffisante pour spécifier des séquences se repliant en structures natives, thermodynamiquement et fonctionnellement similaires aux domaines WW naturels. La possibilité de recréer des fonctions naturelles dans des séquences artificielles montre qu'une quantité relativement faible d'informations de séquences est suffisante pour définir les caractéristiques énergétiques globales d'interactions entre des acides aminés.

Ces méthodes de modélisation peuvent se révéler très utiles. La première méthode des CSB peut jouer un rôle dans l'acquisition d'informations structurales plus précises afin de générer des modèles les plus proches possibles de la réalité pouvant servir de point de départ à une démarche expérimentale. Quant à la deuxième approche de protéines artificielles, elle montre que s'il est possible de résoudre le réseau d'interactions entre les acides aminés pour toutes les protéines, alors les relations structure–fonction pourront être étudiées de façon approfondie jusqu'à pouvoir construire des protéines artificielles ab initio.

1.4.4. Techniques de chimérogenèse semi-rationnelles

Le développement d'algorithmes tels que SCHEMA est très utile pour générer des mutants fonctionnels mais le fait de créer des chimères non mutées dont les points de jonction sont définis nécessite la mise en place de nouvelles techniques de chimérogenèse.

1.4.4.1. Techniques historiques de chimérogenèse

La PCR sexuelle (ou DNA shuffling), familiale ou non, a été le premier moyen de génération d'un grand nombre de chimères (Stemmer 1994 ; Crameri, Raillard et al. 1998). Cette technique consiste à fragmenter le ou les gène(s) d'intérêt, en utilisant généralement une nucléase. Les fragments obtenus sont alors réassemblés pour former des chimères, lors d'une PCR sans amorces exogène où les différents fragments d'ADN dénaturés vont s'hybrider à un autre fragment dans une région de séquence complémentaire et servir de matrice et/ou d'amorces pour l'élongation suivie de la reconstitution du gène entier. Le processus peut être terminé par une PCR effectuée avec deux amorces encadrant la totalité du gène.

Plus particulièrement, la PCR sexuelle familiale utilise la recombinaison de gènes homologues, ce qui permet d'accélérer les processus d'évolution en conservant les mutations bénéfiques et en éliminant les mutations néfastes (Crameri, Raillard et al. 1998) (Figure 25A). Cette méthode a ensuite été améliorée de diverses façons. Une approche a été d'utiliser une matrice exogène similaire mais pas identique aux gènes mélangés pour hybrider les morceaux issus de la fragmentation (méthode RACHITT, Figure 25B (Coco, Levinson et al. 2001)).

Une méthode a exploité la capacité de recombinaison de la levure afin d'effectuer une étape de recombinaison supplémentaire dans cet organisme après transformation des premières chimères (méthode CLERY (Abecassis, Pompon et al. 2003)). Une autre équipe a digéré les matrices originales avec des enzymes de restriction et non de la nucléase, augmentant le nombre de points de recombinaison (Johnston, Huang et al. 2007; Rosic, Huang et al. 2007). Une dernière approche, nommée Staggered Extension Process (StEP) (Figure 26) consiste à digérer les matrices puis à effectuer plusieurs cycles d'amplification courts en présence des matrices parentales où les produits issus de l'amplification précédente vont servir d'amorces.

Le problème de ces méthodes est qu'elles nécessitent de recombiner des gènes possédant une homologie assez importante, pouvant servir de point d'ancrage pour la PCR sans amorces.

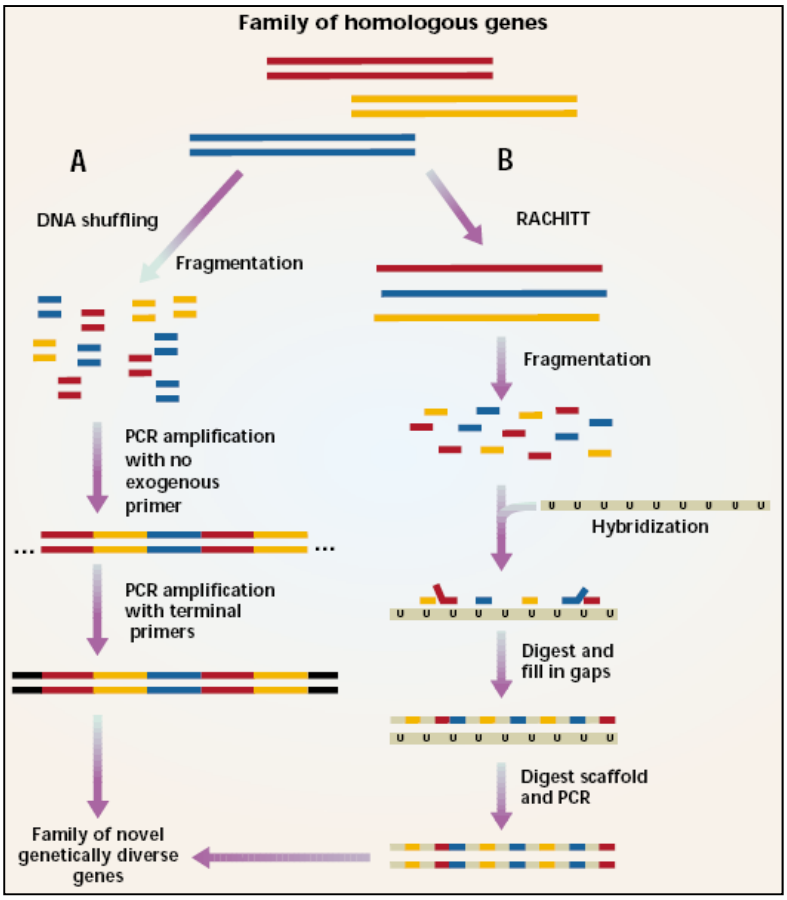


Figure 25. (A) PCR sexuelle familiale "classique" La sélection de petits fragments après la fragmentation augmente la probabilité d'évènements de recombinaison multiples car les fragments servent plus facilement d'amorces lors de la PCR sexuelle (B) Méthode RACHITT (Pelletier 2001).

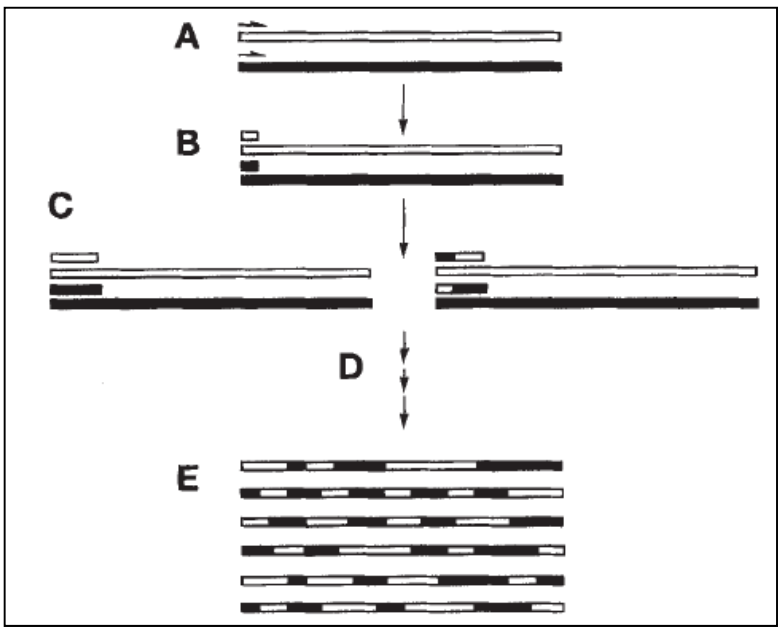


Figure 26. Méthode StEP, seulement une amorce et les simples brins des deux gènes parentaux sont indiqués. (A) Les matrices dénaturées sont amorcées par une amorce définie. (B) De courts fragments sont produits par une brève extension de l'amorce. (C) Par un autre cycle de StEP, les fragments issus de l'étape B servent d'amorces et subissent un nouveau cycle d'élongation. (D) Ce processus est répété jusqu'à production de fragments de la taille totale du gène initial. (E) Les gènes entiers sont purifiés (Zhao, Giver et al. 1998)

1.4.4.2. Chimérogenèse de matrices possédant peu d'homologie

Ces méthodes ont été développées afin de pouvoir créer des chimères de gènes possédant peu d'identité de séquence ou à des endroits très localisés. Il s'agit des méthodes Sequence Homology-Independent Protein RECombination (SHIPREC) (Figure 27) (Sieber, Martinez et al. 2001) et Incremental Truncation for the Creation of HYbrid (ITCHY) (Figure 28). Alternativement, il est possible d'utiliser la méthode SCRATCHY consistant en une construction d'une banque par la méthode ITCHY suivie d'une PCR sexuelle classique. Ces méthodes ont en commun une réalisation relativement lourde par rapport au DNA shuffling classique mais elles sont capables de générer une grande diversité à partir de gènes distants dans l'évolution, comme deux P450s de familles différentes par exemple.

1.4.4.3. Chimères avec des points de jonction définis

Ces méthodes ont été mises au point en association avec l'algorithme SCHEMA. La première méthode (Meyer, Silberg et al. 2003) consiste en l'assemblage de modules d'ADN double brin issus d'oligonucléotides simple brin de chaque enzyme parentale comportant des extrémités sortantes non palindromiques créées grâce à des mutations silencieuses. Ceci permet un assemblage ordonné (uniquement deux à deux) des différents modules, sans risque de formation de concatémères. Les fragments des différentes protéines parentales sont mis en présence puis assemblés deux à deux par ligation. Ces dimères sont ensuite ligués entre eux afin de former deux moitiés de protéines, amplifiées par PCR. Les deux fragments du milieu comportent un site de restriction, les deux moitiés sont donc coupées puis liguées, générant la chimère finale. Même si de nombreuses chimères très diverses sont obtenus par cette technique, elle est extrêmement lourde à réaliser, entre le dessin de tous les oligonucléotides et les multiples ligations à effectuer.

La seconde méthode utilisée, nommée sequence-independent site-directed chimeragenesis (SISDC) (Hiraga and Arnold 2003) est représentée en Figure 29 et Figure 30. Cette méthode est déjà plus simple à réaliser que la précédente même si les différentes étapes sont relativement longues. Par contre, l'assemblage final se faisant par ligation, aucune mutation ponctuelle n'a été détectée dans la banque. Mais la coupure par la nucléase a généré la délétion d'une paire de bases et donc un décalage du cadre de lecture sur 50% des clones obtenus.

Malgré l'efficacité et la simplicité de l'algorithme SCHEMA pour le dessin de banques semi-rationnelles, les méthodes de construction de la banque elle-même semblent difficiles à réaliser, d'autant plus que les séquences obtenues doivent comporter exactement la séquence désirée afin de pouvoir exploiter les informations données par SCHEMA. Cette inadéquation entre la simplicité de l'algorithme et la difficulté de sa mise en œuvre est un des désavantages de cette méthode.

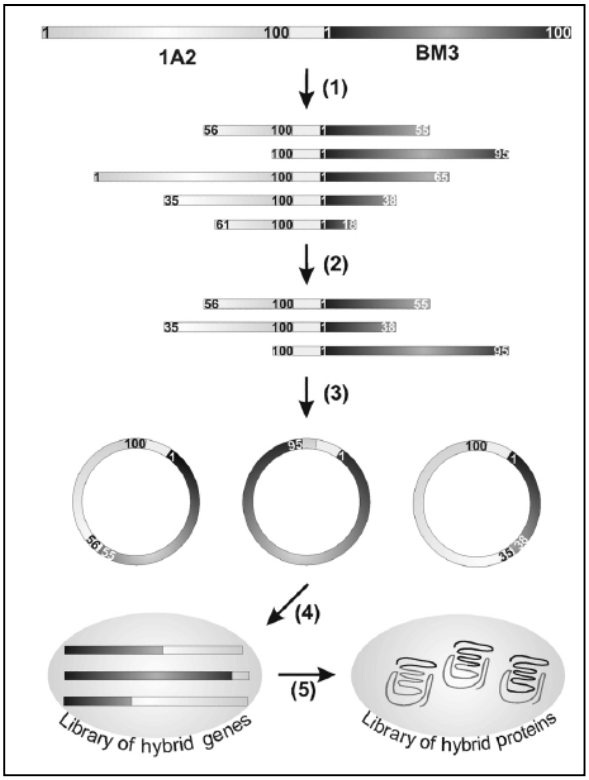


Figure 27. Méthode SHIPREC. Un gène dimérique est construit contenant, de 5' vers 3', un gène de protéine 1 (CYP1A2), une séquence de liaison avec des sites de restriction et le gène de protéine 2 ($P450_{BM3}$). (1) Ce dimère est fragmenté et traité afin d'obtenir des bouts francs (2) Des fragments de la longueur d'un seul gène additionné de la séquence de liaison sont séparés du reste des fragments (3) Ces fragments sont circularisés (4) La linéarisation de cet ADN circulaire par restriction engendre une banque de gènes chimères contenant une partie N-terminale $P450_{BM3}$ et une partie C-terminale CYP1A2, les points de jonction placés aléatoirement (5) Les gènes chimères sont clonés. Les nombres indiqués figurent le pourcentage de longueur du gène total représenté par la séquence à l'intérieur de laquelle il est noté (Sieber, Martinez et al. 2001).

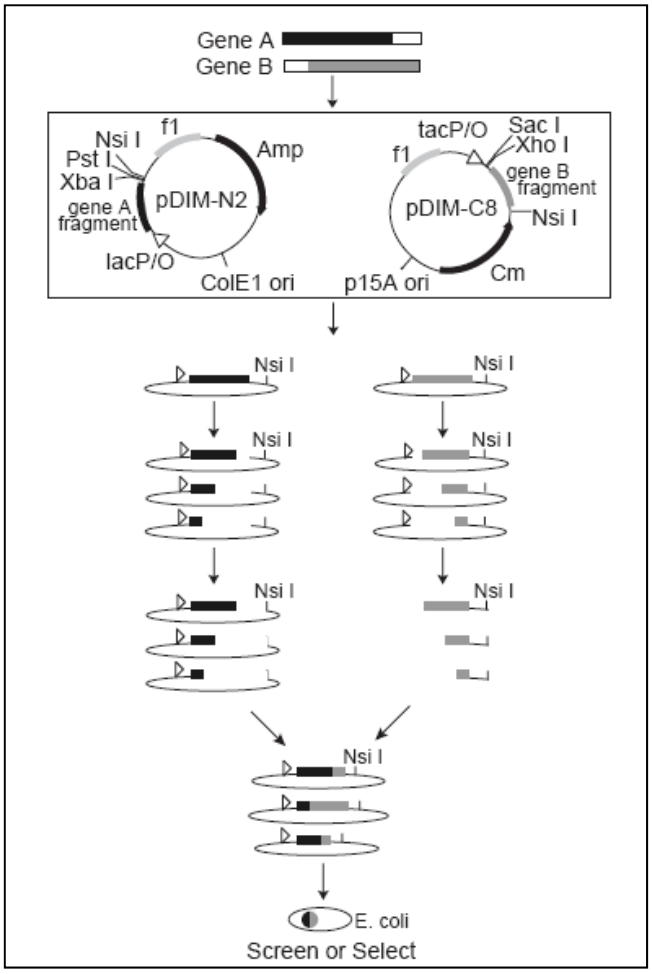


Figure 28. Méthode ITCHY. Un large fragment 5' du gène A et une large portion 3' du gène B sont clonés chacun dans un phagemide comprenant deux gènes différents de résistance aux antibiotiques (Amp et Cm) et différentes origines de réplication (ColE1 ori et p15A ori), afin que ces 2 plasmides puissent être maintenus dans la même cellule. Les phagemides comprennent également des sites de restriction choisis afin de pouvoir créer des banques de fragments de gènes tronqués de façon incrémentielle à partir de l'extrémité 3' du fragment de gène A et l'extrémité 5' du fragment de gène B. Cette coupure incrémentielle est suivie d'une digestion par *Nsi*I, puis de l'isolation des fragments géniques indiqués et enfin d'une ligation afin de former une banque de gènes chimères.

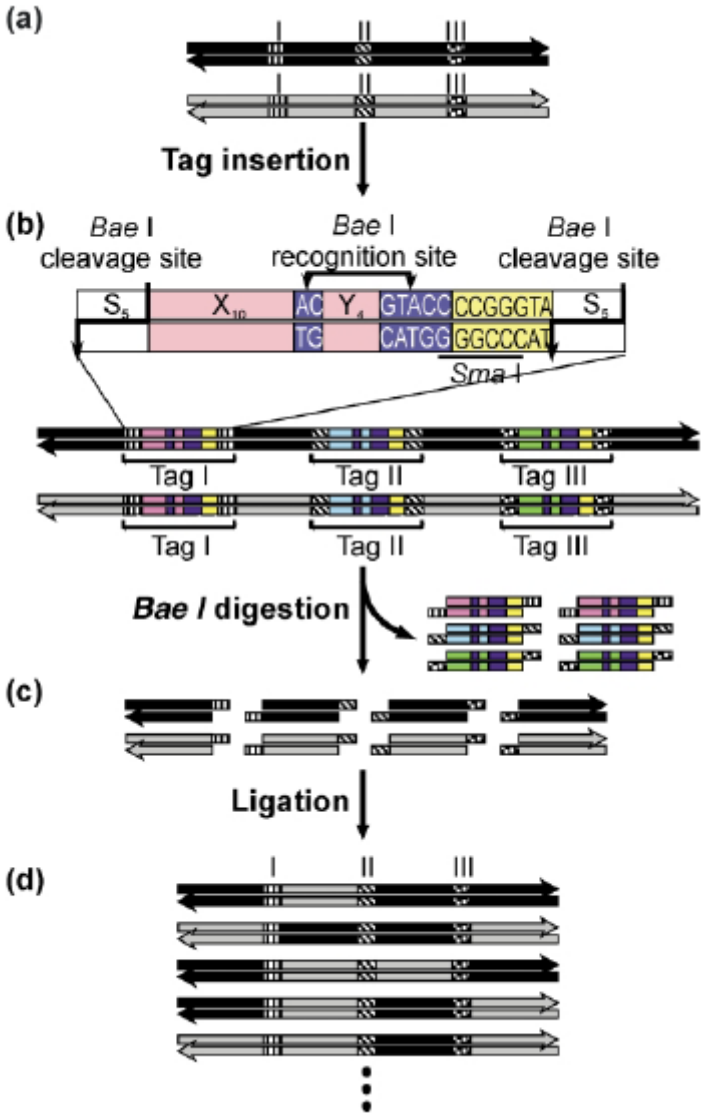


Figure 29. Schéma de la technique SISDC, illustrant la recombinaison entre deux parents au niveau de 3 sites (quatre fragments en tout) (a) Les séquences nucléotidiques des gènes parentaux (A et B) sont alignées, et les séquences consensus à chaque site de recombinaison désiré (I, II et III) sont déterminées. (b) De courtes séquences "tags" (I–III) sont insérées au niveau des sites (I–III). Ces tags contiennent une séquence consensus de 5 paires de bases (S5), une séquence de reconnaissance pour l'endonucléase de type IIb (*Bae*I) (en bleu), deux régions variables (X10 et Y4: rose pour le site I, cyan pour le site II et vert pour le site III), une région constant (en jaune) et un site *Sma*I (souligné). (c) Les régions tags insérées sont enlevées par un traitement avec l'endonucléase et des bouts collants sont produits (d) Les fragments mélangés sont capables de reconnaître les fragments censés être leurs voisins dans la séquence finale et les fragments des différents parents sont ligués les uns avec les autres dans l'ordre désiré. Après cette étape, une digestion par *Sma*I élimine tous les tags non traités restant dans la banque de chimères finales. En fait, lors de l'expérience, deux moitiés de chimères sont générées par cette méthode puis assemblés par ligation pour obtenir les séquences finales (Hiraga and Arnold 2003).

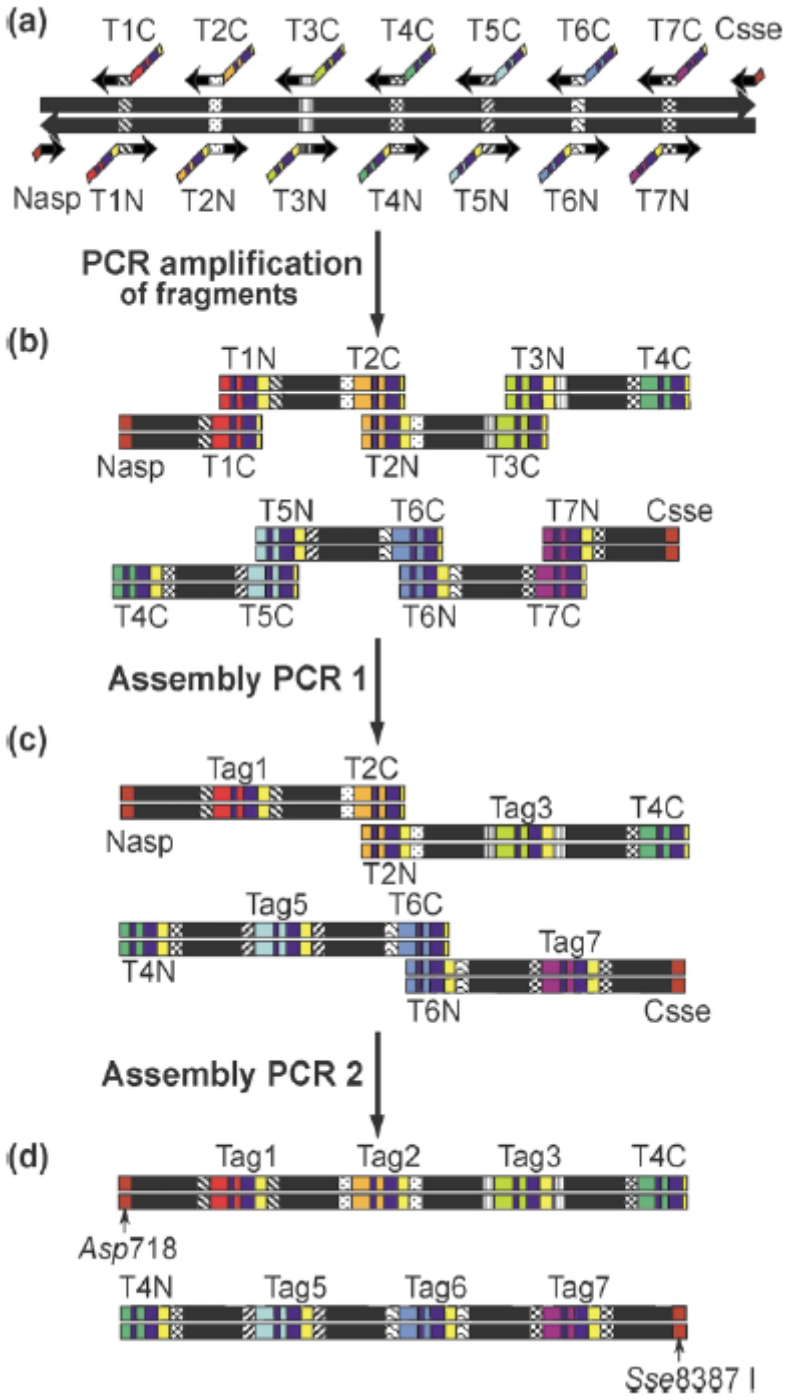


Figure 30. Construction des moitiés de gènes parentaux comportant les régions tag pour la méthode SISDC (ici dans la cas de la TEM-1 b-lactamase) (a) Amplification par PCR des fragments avec les tags. (b)–(d) Les gènes parentaux comportant les tags sont construits par des PCR fusion séquentielles en utilisant les séquences complémentaires contenus dans le tag. Les moitiés de gènes parentaux sont ensuite soumises à la méthode SISDC proprement dite (Hiraga and Arnold 2003).

Sous le nom de méthodes semi-rationnelles sont regroupées des approches très diverses. Certaines visent à réduire les besoins en criblage en essayant d'affiner au maximum les techniques de génération de banque, d'autres au contraire essaient d'exploiter la pléthore d'informations induite par les méthodes d'évolution dirigée. Mais leur but commun est de définir des moyens pertinents pour relier les classifications structurales et fonctionnelles des variants. Ceci est en effet essentiel pour construire des modèles prédictifs de relations structure-fonction.

En conclusion, l'étude des relations séquence-structure-fonction au sein des protéines est un vaste sujet, englobant de nombreuses approches différentes. Mais toute ont un même but : mieux comprendre les paramètres régissant les protéines et leur évolution. En effet, les récents séquençages de génome ont permis de déterminer beaucoup de nouveaux gènes "orphelins" de fonction (Roberts 2004). Mais ce qui est illustré ici montre qu'aucune approche individuelle de l'ingénierie et de la prédiction des relations structure –fonction n'est auto-suffisante. De fortes complémentarités existent entre les approches *ab initio* basées sur la structure et les méthodes combinatoires expérimentales associées ou non aux statistiques.

2. Thérapies anticancéreuses

2.1. INTRODUCTION 63
2.2. THERAPIES NON MEDICAMENTEUSES 63
2.3. CYTOTOXIQUES INDIRECTS 63
2.3.1. Antiangiogéniques 63
2.3.2. Anticorps 64
2.3.3. Thérapies hormonales 65
2.4. ANTINEOPLASIQUES/CYTOTOXIQUES DIRECTS 65
2.4.1. Antibiotiques antitumoraux 65
2.4.2. Antimétaboliques (analogue de bases/blocage voie de synthèse) 66
2.4.3. Agents alkylants 67
2.5. UTILISATION DES NANOPARTICULES 68
2.5.1. Diagnostic 68
2.5.2. Imagerie 68
2.5.3. Délivrance 69
2.5.4. Types de nanoparticules 72
2.6. THERAPIE GENIQUE 73
2.6.1. Principe et exemples 73
2.6.2. Vectorisation 73
2.7. THERAPIE ENZYME-PRODROGUE 75
2.7.1. Introduction 75
2.7.2. Thérapie enzyme-prodrogue : application en cancérologie 76
2.7.3. GDEPT 78
2.7.4. Cyclophosphamide 81
2.7.5. CYP2B6 84
2.7.6. Utilisation du couple CYP2B/oxazaphosphorines pour une GDEPT 85
2.8. GENOTOXICITE 93
2.8.1. Mécanismes généraux 93
2.8.2. Mécanismes de réparation et protéines impliquées 94
2.8.3. Réponse globale aux dommages à l'ADN 95
2.8.4. Tests de génotoxicité 96
2.8.5. Utilisation d'un gène rapporteur dans la levure 97

2.1. Introduction

Le vieillissement de la population et les changements de mode de vie successifs ont contribué à faire augmenter au cours du temps le nombre de personnes atteintes du cancer, jusqu'à faire de cette maladie un problème de santé publique. Divers types de thérapie ont été développées au cours du temps, à visée d'action locale (chirurgie, radiothérapie…) ou générales (chimiothérapie, hormonothérapies,…). Le but ultime des toutes ces thérapies est d'induire une cytotoxicité sur toutes les cellules cancéreuses de l'organisme du patient afin d'éviter toute récidive. Ceci est théoriquement réalisable en exploitant le fait que les cellules cancéreuses présentent un phénotype différent des cellules normales. En plus du fait qu'elles se divisent plus que la plupart des cellules saines, les cellules cancéreuses présentent une spécificité d'expression de certains marqueurs protéiques, qui sont d'ailleurs extensivement étudiés afin de pouvoir les utiliser à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

2.2. Thérapies non médicamenteuses

En ce qui concerne les tumeurs solides, leur résection par chirurgie constitue la thérapie la plus ancienne. La chirurgie est actuellement de plus en plus combinée avec d'autres méthodes de chimio- ou de radiothérapie pré- ou postopératoires afin d'assurer son succès et d'éviter l'apparition de métastases et de récidives. Des techniques d'imagerie utilisées avant ou pendant l'excision permettent également un meilleur ciblage des régions à retirer.

Une autre approche utilisée depuis longtemps en oncologie est la radiothérapie. Cette méthode de traitement locale de la tumeur consiste à détruire les cellules cancéreuses par divers types de radiations, *via* des sources externes ou l'injection de radionucléides. L'avantage de ces thérapies est le ciblage des rayonnements à la zone tumorale. La radiothérapie peut également être utilisée en association avec la chirurgie et la chimiothérapie.

Ces deux méthodes ont été récemment améliorées par diverses approches biotechnologiques qui seront détaillées plus loin.

2.3. Cytotoxiques indirects

2.3.1. Antiangiogéniques

Ce type de thérapie se base sur le fait que lors de la formation d'une tumeur, les cellules cancéreuses stimulent les facteurs angiogéniques (Hanahan and Folkman 1996) afin de construire un réseau vasculaire nécessaire à leur croissance anarchique. Ceci se fait par le biais de l'expression, régulée par des oncogènes(Rak, Yu et al. 2000), de protéines pro-angiogéniques telles que, entre autres, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), les facteurs de croissance fibroblastiques acide et basique (a et bFGF), le facteur de croissance tumorale β-1 (TGF β -1), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance placentaire (PLGF) et la pléiotrophine (Relf, LeJeune et al. 1997).

Un autre mécanisme est l'inhibition par les oncogènes de facteurs suppresseurs de l'angiogenèse, tel la thrombospondine (Dameron, Volpert et al. 1994).

Les antiangiogéniques peuvent être de deux types : directs ou indirects (Figure 31).

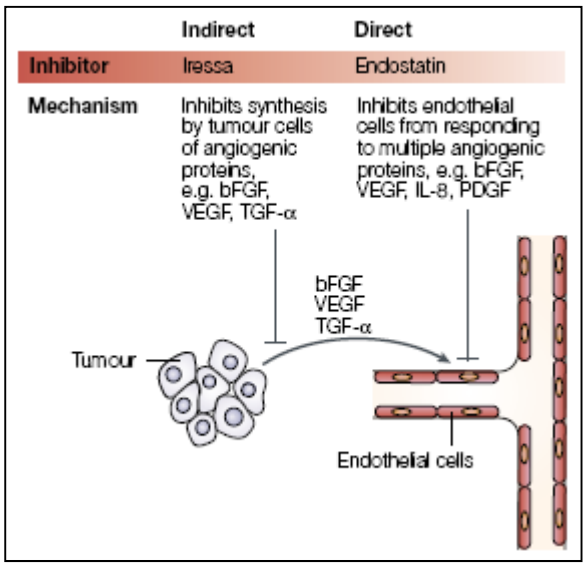


Figure 31. Inhibiteurs directs et indirects de l'angiogenèse. Les inhibiteurs directs visent les cellules endothéliales qui sont recrutées par la tumeur et les empêchent de répondre à des mitogènes endothéliaux divers. Les inhibiteurs indirects visent les protéines exprimées par les cellules tumorales (Kerbel and Folkman 2002).

2.3.2. Anticorps

Les tumeurs sont capables d'échapper à la surveillance immunitaire selon différents mécanismes et sont rarement rejetées par les lymphocytes T cytotoxiques :

- soit par manque de peptide antigénique distinct,
- soit par manque d'expression de molécules d'adhésion ou de co-stimulation qui induisent l'activation des lymphocytes T auxiliaires (donc de la réponse immunitaire),
- soit par sécrétion de cytokines immunosuppressives, tel le TGF-b qui diminue la réponse inflammatoire des cellules T et donc l'immunité cellulaire ou encore telle l'interleukine 10 qui inhibe l'activité et le développement des cellules dendritiques, super-présentatrices d'antigènes (ex : dans le mélanome, le carcinome ovarien, le lymphome à cellules B),
- soit par perte d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I manque d'activation des cellules T cytotoxiques par absence de présentation de peptides par le CMH de classe I s'observe principalement dans les tumeurs viro-induites comme par exemple dans le cancer du colon, de la prostate, du col de l'utérus. Cependant cette absence d'expression à la surface des cellules tumorales provoque l'activation des cellules NK qui tuent les cellules recouvertes d'anticorps (Ac) de nature IgG et n'exprimant pas ou peu le CMH de classe I à leur surface (cellules infectées par un virus, cellules tumorales).C'est le phénomène d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps), d'où l'intérêt de l'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés en cancérothérapie lorsque les anticorps peuvent être fixés sur les cellules tumorales par des antigènes (Ag) spécifiques de surface.

Le but du développement de vaccins anticancéreux a pour but de briser la tolérance du système immunitaire vis-à-vis d'antigènes exprimés principalement ou exclusivement par les tumeurs. Pour cela des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre des antigènes tumoraux, seuls ou conjugués à une toxine ou à un radioisotope, sont utilisés.

Un exemple est l'anticorps dirigé contre le récepteur HER2, un stimulateur de la prolifération cellulaire, dont la surexpression est associée avec certains types de cancer. L'administration de l'anticorps seul à des femmes présentant des cellules cancéreuses du sein contenant le récepteur, a entraîné une diminution de la taille des tumeurs (Slamon, Leyland-Jones et al. 2001)

2.3.3. Thérapies hormonales

Pour certains cancers, la croissance des cellules tumorales est hormonodépendante. Le but de la thérapie est donc d'inhiber l'influence des hormones sur les cellules cancéreuses.

Antioestrogènes : Ils sont fréquemment utilisés dans les cancers du sein où les cellules tumorales présentent des récepteurs aux œstrogènes.

Le tamoxifène est une prodrogue cytostatique, métabolisée par les CYP3A4 et 2D6, dont les métabolites actifs se fixent de façon compétitive et antagoniste au récepteur des œstrogènes, dans le sein (Desta, Ward et al. 2004). La fixation du ligand induit l'inhibition de la transcription des gènes induits par les œstrogènes et bloque les cellules en phase G0 ou G1 (Wang, Fulthorpe et al. 2004).

Les inhibiteurs du CYP19 (ou aromatase) bloquent la synthèse d'œstrogènes réalisée par cette enzyme dans les tissus périphériques des femmes ménopausées (Miller 2003), inhibant ainsi la prolifération des cellules tumorales (Miller, Anderson et al. 2005).

Antiandrogènes : Le flutamide, premier antiandrogène découvert, le nilutamide et le bicalutamide sont utilisés dans le traitement du cancer de la prostate hormonodépendant. Ce sont des molécules non stéroïdiennes qui se fixent de façon compétitive au récepteur de la dihydrotestostérone (Brogden and Chrisp 1991). Le plus souvent, ils sont utilisés en association avec des analogues de l'hormone de la gonadolibérine qui vont diminuer la production de testostérone (Schellhammer, Sharifi et al. 1995).

2.4. Antinéoplasiques/Cytotoxiques directs

2.4.1. Antibiotiques antitumoraux

Les antibiotiques antitumoraux constituent un large groupe de molécules diverses antinéoplasiques dérivées de composés naturels synthétisés par différentes souches de *Streptomyces* (Weiss 1992). Des composés tels que les anthracyclines, les bléomycines, l'actinomycine D ou encore les mitomycines C, antibiotiques et antinéoplasiques, possèdent de nombreux mécanismes de cytotoxicité. Ces processus sont aussi divers que l'intercalation

dans l'ADN, la formation d'adduits covalents, la formation de radicaux oxygénés et l'induction de cassures double et simple brin (Ross and Bradley 1981 ; Hecht 2000). L'inhibition d'enzymes tels que la topoisomérase II (Zhang, D'Arpa et al. 1990), l'ARN polymerase ou encore la cytochrome c oxydase (Muller, Niethammer et al. 1998) font également partie des propriétés de ces antibiotiques.

2.4.2. Antimétaboliques (analogue de bases/blocage voie de synthèse)

L'effet antinéoplasique de cette classe de drogues est lié à leur capacité d'inhiber la réplication ou la transcription correcte de l'ADN, soit en inhibant la synthèse de bases, soit en s'intégrant dans le brin d'ADN néosynthétisé lors de la réplication, induisant finalement l'apoptose.

Analogues de bases : les analogues de pyrimidines, de purines et les antifolates sont capables de compromettre la réplication cellulaire. Ces composés sont en effet capables d'inhiber certains enzymes impliqués dans la biosynthèse *de novo* ou le recyclage des bases de l'ADN et de l'ARN (Harbers, Chaudhuri et al. 1959 ; Ewald, Sampath et al. 2008). Ils peuvent également bloquer l'ADN polymérase en se fixant directement dessus ou en s'incorporant dans les brins d'ADN et d'ARN néosynthétisés (Karran and Attard 2008).

Poisons du fuseau : Ces médicaments agissent en interférant avec la dynamique des microtubules nécessaires à la formation du fuseau mitotique, empêchant ainsi les cellules de se diviser et induisant l'apoptose (Mollinedo and Gajate 2003). Les vinca-alcaloïdes, issus de la pervenche, se fixent à un site qui leur est spécifique sur la tubuline et empêche une polymérisation correcte de microtubules (Schmidt and Bastians 2007). Les taxanes, diterpènes issus de l'if, se fixent préférentiellement sur la β-tubuline des microtubules polymérisés (Rao, He et al. 1999) et induit leur stabilisation.

Inhibiteurs des topoisomérases : la fixation de ces composés sur les topoisomérases, responsables de la modification de la topologie de l'ADN, induit une déstabilisation de la réplication et de la transcription des cellules. L'irinotecan et le topotecan, des dérivés de la camptothécine (Rothenberg, Kuhn et al. 1993), se fixent sur le complexe topoisomérase I - ADN et le stabilise, empêchant la religation des cassures simple brin induites par l'enzyme. L'étoposide et le teniposide, issus de la podophylline (Hande 1998), sont capables de stabiliser le complexe topoisomérase II - ADN après que l'enzyme ait effectué une cassure double brin (Chen, Yang et al. 1984).

2.4.3. Agents alkylants

Ces molécules sont cytotoxiques via 3 mécanismes distincts ayant le même point de départ : la formation d'un groupement alkyl électrophile, capable d'attaquer les groupements nucléophiles des macromolécules. Cette fixation peut entraîner soit la mise en route des enzymes de réparation qui vont fragmenter l'ADN, soit des mésappariements entre des bases G et T, soit la formation de ponts intra- et inter-brins d'ADN. La cytotoxicité et la mutagénicité de ces agents est principalement liée à la formation de ces adduits ainsi qu'aux interférences qu'ils provoquent au niveau de la réplication et de la transcription (Bohr, Phillips et al. 1987). Les agents alkylants peuvent agir lors de toutes les phases du cycle cellulaire (Barton-Burke and Wilkes 2006) et, en plus d'être antinéoplasiques, sont eux-mêmes mutagènes et carcinogènes (Povirk and Shuker 1994 ; Bignold 2006).

Des composés comme les aziridines (King, Wong et al. 1984 ; Maanen, Smeets et al. 2000), les sulfonates alkylés ou les nitrosourées (Frei, Swenson et al. 1978 ; Singer 1985) forment *via* divers mécanismes des groupements alkyls électrophiles. Quant aux sels de platine, qui ne sont pas des agents alkylants à proprement parler, ils sont activés par une réaction d'aquation remplaçant le chlore par une molécule d'eau, ce qui peut déclencher une attaque sur des groupes nucléophiles des macromolécules (Roberts and Pascoe 1972 ; Pascoe and Roberts 1974 ; Pascoe and Roberts 1974).

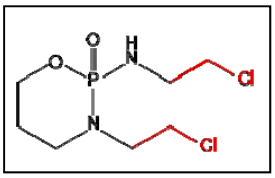


Figure 32. Molécule d'ifosfamide. Le groupement bischloroethyl est surligné en rouge.

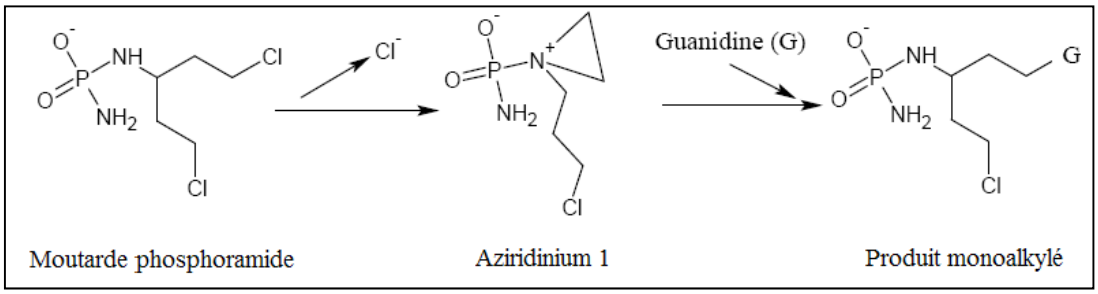


Figure 33. Mécanisme d'action des moutardes azotées. Le produit monoalkylé peut former un 2ème composé aziridinium à partir du 2ème groupement chloroethyl, entraînant des ponts intra ou interbrins.

Les composés nous intéressant particulièrement sont les moutardes azotées. Ces molécules sont des agents alkylants bifonctionnels, capables de former des ponts inter- ou intra-brins, car elles possèdent un groupement bischloroethyl (Figure 32) leur permettant de se fixer à deux molécules nucléophiles simultanément (Fox and Scott 1980).

Le site de fixation principal des moutardes azotées est l'azote 7 de la guanine, les adduits à d'autres positions étant moins fréquents (Bubley, Ogata et al. 1994). Les composés actuellement utilisés en thérapie sont la mechlorethamine, le cyclophosphamide, l'ifosfamide, le melphalan et le chlorambucil.

Des thérapies anticancéreuses très variées existent aujourd'hui, développées sur des bases de chirurgie, de radiothérapie et de nombreux médicaments agissant, directement ou non, sur les cellules cancéreuses en provoquant une cytotoxicité. Toutes ces thérapies reconnues et largement utilisées peuvent être utilisées seules ou, le plus souvent, en combinaison. Une immense variété de protocoles de traitement est mise à la disposition des équipes médicales (Hubeek, Litvinova et al. 2004 ; Soffietti, Leoncini et al. 2007; Grothey 2008). Récemment, certains de ces traitements ont été améliorés grâce à l'utilisation de nanoparticules.

2.5. Utilisation des nanoparticules

Les nanoparticules sont des matériaux à deux dimensions ou plus, d'une taille de 1 à 100 nm (Sanvicens and Marco 2008) et peuvent être composés de polymères organiques ou d'éléments inorganiques. Dans le cadre de la cancérologie, ces nanoparticules sont actuellement utilisées dans trois principaux domaines : le diagnostic, l'imagerie et la délivrance, afin de d'améliorer les performances des techniques déjà existantes.

2.5.1. Diagnostic

Les méthodes classiques pour le diagnostic du cancer reposent encore aujourd'hui en grande partie sur des analyses microscopiques de biopsie de patients, donnant parfois lieu à des interprétations de faux positifs (Gourley, Hendricks et al. 2005). Les nanoparticules peuvent améliorer ces méthodes en permettant un marquage plus précis et une détection plus sensible de marqueurs connus du cancer.

Dans un protocole de marquage immunohistochimique, des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques du cancer de la prostate et du sein ont ainsi été couplés à des Quantum Dots, des nanoparticules fabriquées à base de semi-conducteur présentant une fluorescence beaucoup plus stable que les marqueurs classiques (Wu, Liu et al. 2003; Xing, Chaudry et al. 2007).

Les nouvelles techniques de diagnostic précoce en cancérologie, reposent aussi sur des biopuces à ADN ou protéines spécifiques de certains types de cancer. La détection sur ces biopuces peut être améliorée grâce à des nanoparticules d'or fixées sur les anticorps ou les sondes ADN utilisées (Choi, Jun et al. 2006 ; Jain 2007).

2.5.2. Imagerie

Les techniques utilisant des nanoparticules sont également utiles pour l'imagerie classique *in vivo*. Des particules métalliques sont ainsi utilisées comme agent de contraste en IRM

(Choi, Jun et al. 2006). Ceci a été utilisé afin de cibler plus finement des radiothérapies en les couplant à ces techniques d'imagerie (John, Zietman et al. 2008). De la même façon que pour le diagnostic, des nanoparticules, le plus souvent métalliques, sont ciblées vers des cellules cancéreuses qui sont ensuite visualisées par des méthodes d'imagerie classiques (Fortina, Kricka et al. 2007 ; Liu, Miyoshi et al. 2007; Pauwels and Erba 2007). Ces techniques peuvent être aussi très utiles lors de chirurgies afin de délimiter de façon précise les bords d'une tumeur

2.5.3. Délivrance

Le problème des thérapies actuelles est, selon les approches, leur manque de sélectivité pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines impliquant une toxicité systémique importante, des concentrations de principe actif faibles au niveau de la tumeur (Figure 34A) et l'apparition de résistance aux médicaments. Beaucoup de ces problèmes peuvent être contournés par l'utilisation de nanoparticules (Figure 34).

2.5.3.1. Circulation

Plus le temps de circulation des nanoparticules dans les vaisseaux est long, plus les chances de délivrer le médicament au niveau de la tumeur sont grandes. Afin d'éviter l'élimination des nanoparticules par le système immunitaire, il est nécessaire de fonctionnaliser les nanoparticules avec un polymère hydrophile comme le PolyEthylèneGlycol (PEG) (Gref, Luck et al. 2000 ; Otsuka, Nagasaki et al. 2003) pour créer une surface "furtive" pour l'opsonisation, et permettre ainsi que les protéines sériques adhèrent à la surface de la nanoparticule (Fawaz, Bonini et al. 1993). Une charge légèrement positive ou négative évite également l'attaque du système réticuloendothélial (Davis, Chen et al. 2008).

2.5.3.2. Ciblage passif (Figure 34B)

Ce ciblage exploite l'effet d'augmentation de la perméabilité et de la rétention (EPR). L'effet EPR est la propriété par laquelle des molécules d'une certaine taille, typiquement des nanoparticules ou des médicaments macromoléculaires, tendent à s'accumuler dans les tissus tumoraux beaucoup plus que dans les tissus sains. L'explication donnée de ce phénomène est que les tumeurs stimulent la production de vaisseaux sanguins anormaux par leur forme et architecture, pauvrement alignés, manquant de cellules endothéliales et présentant de larges fenestrations. Les tumeurs sont également souvent déficientes pour leur système de drainage lymphatique. Tous ces facteurs mènent à une dynamique de transport anormale pour les molécules et les fluides (Iyer, Khaled et al. 2006).

Un autre ciblage possible est l'utilisation de charges électrostatiques. Il a été prouvé que des liposomes cationiques se lient par interactions électrostatiques aux phospholipides chargés négativement exprimés préférentiellement sur les cellules endothéliales (Ran, Downes et al. 2002; Krasnici, Werner et al. 2003).

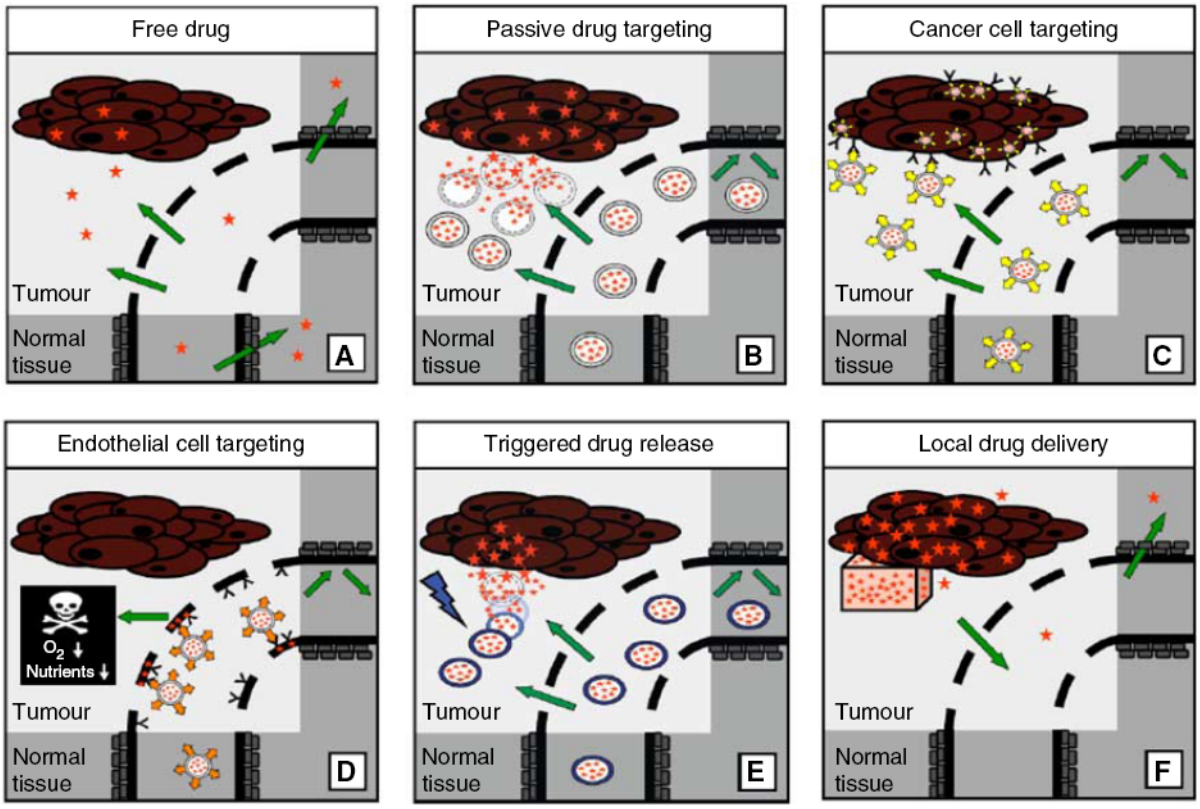


Figure 34. Aperçu des stratégies de ciblage de médicaments les plus pertinentes cliniquement. Les cellules cancéreuses sont représentées en marron, les nanoparticules sous forme de cercles (A) Molécule sans ciblage (B) Ciblage passif (C) Ciblage actif vers les cellules tumorales (D) Ciblage actif vers les cellules endothéliales (E) Nanoparticules sensibles aux stimuli activées par des signaux physiques externes (F) Systèmes de délivrance progressif de médicaments implantés lors d'une chirurgie ou injectés directement dans les (parties non résécables des) tumeurs (Lammers, Hennink et al. 2008).

2.5.3.3. Ciblage actif (Figure 34C et D)

Le ciblage augmente en premier lieu, non pas la concentration des nanoparticules au niveau de la tumeur, plutôt due à l'effet EPR, mais l'internalisation des particules dans les cellules ciblées (Kirpotin, Drummond et al. 2006 ; Hatakeyama, Akita et al. 2007). Les molécules de ciblage quelles que soient leur type se basent sur les différences de phénotype des cellules tumorales et saines telles que la néovascularisation importante, la croissance cellulaire incontrôlée et également les marqueurs spécifiques exprimés dans les différents types de cancers (Byrne, Betancourt et al. 2008). L'identité et la caractéristique des molécules de ciblage sont aussi importantes pour le temps de circulation des nanoparticules et l'affinité de fixation.

Anticorps : les anticorps sont par définition des molécules de ciblage, reconnaissant un épitope précis. Il a été observé que la fixation du fragment Fab seul d'un anticorps monoclonal augmentait le temps de circulation de la nanoparticule par rapport à la fixation de l'immunoglobuline entière (Maruyama, Takahashi et al. 1997 ; Sapra, Moase et al. 2004). Aujourd'hui les fragments d'anticorps contenant seulement la partie variable sont les plus utilisés car ils présentent une bonne spécificité et une petite taille.

Ils peuvent être fixés sur les nanoparticules directement ou via des molécules de liaison comme le PEG. La conjugaison peut se faire de manière aléatoire par des liaisons entre les lipides et les acides aminés de l'anticorps mais cette méthode réduit l'affinité de la nanoparticule pour son ligand (Chapman 2002) Une fixation spécifique via des groupements thiols de cystéine assure une meilleure activité (Chapman, Antoniw et al. 1999).

Ligands : un autre moyen de cibler les cellules cancéreuses est d'utiliser la reconnaissance naturelle existant entre les récepteurs et leurs ligands respectifs et l'internalisation qui s'ensuit dans la majorité des cas. Ces ligands, le plus souvent peptidiques (aptamères) ou protéiques, peuvent permettre le ciblage en se fixant sur des récepteurs qui sont spécifiquement surexprimés dans les cellules cancéreuses (Nisato, Tille et al. 2003).

Magnétisme : de façon plus épisodique, des particules présentant des propriétés magnétiques sont également utilisées pour cibler les tumeurs. Par exemple, une étude a montré que des anticorps couplés à un radionucléide et à des particules magnétiques possédait un ciblage tumoral important et une cytotoxicité de l'hôte réduite lorsqu'un champ magnétique est appliqué au niveau de la tumeur (Chen, Wu et al. 2006).

Particules métalliques : cette technologie est couplée avec les méthodes de diagnostics exploitant les particules d'or exposées précédemment pour le diagnostic. En effet, le chauffage de ces particules par un laser, par ailleurs sans effet sur les cellules, peut tuer les cellules contenant les particules métalliques (Figure 34E), permettant une thérapie

extrêmement ciblée (El-Sayed, Huang et al. 2006). Ce même type d'approche diagnostique par imagerie (microscopie, imagerie par résonance magnétique IRM) puis thérapie avec des particules d'or a été utilisée avec des rayonnements infrarouges (Hirsch, Stafford et al. 2003 ; Loo, Lin et al. 2004 ; O'Neal, Hirsch et al. 2004).

Association avec la chirurgie (Figure 34F) : la chirurgie peut être associée à des systèmes de délivrance à libération prolongée. Ces implants sont introduits lors de la chirurgie dans les parties de la tumeur ne pouvant être retirées et permettent une libération plus ciblée de la chimiothérapie. Les polymères et les liposomes, plutôt destinés à une administration systémique, semblent aussi convenir à ce genre d'approche (Lammers, Peschke et al. 2006).

Association avec la radiothérapie : cette association peut s'effectuer de deux manières. La première est de traiter simultanément par chimiothérapie ciblée grâce à des nanoparticules et par radiothérapie. Il a été prouvé que dans ce cas les deux thérapies agissaient de façon synergique, la radiothérapie augmentant l'accumulation du système de délivrance au niveau des tumeurs et les nanoparticules améliorant l'interaction entre les deux types de thérapies (Lammers, Subr et al. 2008). Le deuxième moyen de combiner ces approches est de faire transporter par les nanoparticules ciblées des molécules capables de concentrer l'énergie des rayonnements et permettant d'utiliser une dose plus faible avec moins de risques pour les tissus sains avoisinants, comme des sortes d'"agents de contraste", mais pour la radiothérapie (McMahon, Mendenhall et al. 2008).

2.5.4. Types de nanoparticules

Il existe de très nombreux types de nanoparticules présentant des propriétés biophysiques différentes. Elles peuvent être polymériques comme les dendrimères, les fullerenes ou les nanotubes; sphériques comme les micelles, les liposomes, les nanosphères ou les nanocapsules. La forme de cage hydrophobe entourée d'une paroi hydrophile de la cyclodextrine est également indiquée pour le transport de molécules Ces nanoparticules présentent également des hydrophobicités et des modes de fixation des molécules transportées très différents, offrant un large choix de caractéristiques. Elles peuvent également toutes être fonctionnalisées en surface afin d'assurer un transport optimal jusqu'à la cible choisie.

Les nouvelles techniques impliquant les nanoparticules, bien qu'assez récentes, sont très prometteuses car elles permettent d'éviter de nombreux désavantages rencontrés avec les thérapies classiques, notamment les lourds effets secondaires observés avec les chimiothérapies qui sont diminués par le ciblage du traitement. Beaucoup de systèmes sont actuellement en développement, certains sont même déjà commercialisés. Le problème de ces thérapies est le manque de recul sur les éventuels effets à long terme générés par ces particules (De Jong and Borm 2008).

2.6. Thérapie génique

2.6.1. Principe et exemples

La thérapie génique peut être définie comme le transfert de matériel génétique dans une cellule de façon permanente ou transitoire afin d'altérer le phénotype cellulaire. Le point clé de ce type de thérapie est le ciblage du matériel génétique et sa vectorisation dans la cellule. En plus de transférer des transgènes exprimant une protéine, il est possible d'intégrer dans les cellules des molécules d'ARN antisens ou d'ARN dits interférents, complémentaires de l'ARNm d'une protéine et inhibant sa transcription correcte. Ces trois types de thérapie ont déjà utilisées dans le traitement de cancer en ciblant divers gènes impliqués dans la cancérogenèse :

- ***p53*** : gène suppresseur de tumeurs classique impliqué dans le cycle cellulaire et l'apoptose, cible précoce pour la thérapie génique des cancers (Swisher, Roth et al. 1999 ; Lane and Lain 2002).
- ***Gènes de l'apoptose*** : un ARN antisens bloquant la transcription du gène Bcl-2, antiapoptotique, a montré une certaine efficacité en combinaison avec du docetaxel (Marshall, Chen et al. 2004).
- ***Gènes impliqués dans l'angiogenèse*** : un ARN interférent correspondant au gène de VEGF induit une décroissance de la densité des microvaisseaux et réduit la croissance tumorale dans des modèles de souris ou des modèles de tumeurs traitées *ex vivo* (Tao, Tu et al. 2005 ; Raskopf, Vogt et al. 2008 ; Wang, Liu et al. 2008).
- ***Gènes de l'immunité*** : indirectement, dans le traitement du mélanome, il a été montré que la transfection des gènes codant pour le HLA-B7 et la β2 microglobuline uniquement dans les cellules tumorales induisent une réponse immunitaire de l'organisme contre les cellules cancéreuses. Cette thérapie est utile lorsqu'il y a présence de métastases qui seront reconnues par les anticorps circulants quelles que soient leurs localisations (Gonzalez, Hutchins et al. 2006).

2.6.2. Vectorisation

Depuis le début, le problème majeur de la thérapie génique a été la délivrance des gènes d'intérêt sélectionnés au niveau des cibles désirées. Les caractéristiques d'un bon vecteur sont le ciblage spécifique des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, la délivrance dans les cellules en division ou quiescentes, la résistance à l'immunité humorale et une réponse inflammatoire te toxique faible.

2.6.2.1. Virus

Les vecteurs viraux ont été les premiers exploités pour leur capacité à intégrer leur génome dans la cellule de leur hôte. Les parties de leur génome pouvant conduire à une pathogénicité sont délétées.

Après ce processus, les protéines virales qui manqueraient potentiellement à la formation des particules virales thérapeutiques sont fournies par des cellules, dites productrices ou d'encapsidation, lors de la phase de production des vecteurs

L'expression sélective, dans les cellules cancéreuses, du transgène contenu dans les vecteurs viraux est réalisée *via* la régulation de l'expression par des régions promotrices spécifiques des tumeurs. Par exemple, une glycoprotéine surexprimée et glycosylée de façon aberrante lors de cancers du sein et d'autres carcinomes (Chen, Chen et al. 1995), l'α-fetoprotéine pour les hépatomes et l'antigène carcinoembryonique (CEA) pour les carcinomes colorectaux, du poumon et du sein (Osaki, Tanio et al. 1994) ont été utilisés. Des promoteurs induits par l'hypoxie (Suzuki, Singh et al. 1996) ou par les rayons X ont également été testés (McCarthy, Worthington et al. 2007).

L'oncolyse virale, exploitant le fait que la réplication correcte d'un virus induit la destruction cellulaire de l'hôte de ce virus, est aussi une méthode encourageant l'usage des virus. Le but est d'infecter spécifiquement les cellules tumorales avec un virus réplicatif conduisant à la cytotoxicité de toute la population des cellules tumorales. Une stratégie a été élaborée en utilisant des vecteurs adénoviraux (Roy and Waxman 2006) ou un virus herpes simplex (Chase, Chung et al. 1998). Des séquences promotrices spécifiques aux tumeurs, placées devant les gènes viraux requis pour la réplication (Saukkonen and Hemminki 2004) ont aussi prouvées une efficacité relative (Hallenbeck, Chang et al. 1999 ; Chen, DeWeese et al. 2001), malgré une réplication virale basale dans des tissus non-cibles.

2.6.2.2. Méthodes non-virales

ADN nu : De l'ADN sous forme de plasmide peut être injecté directement dans les cellules musculaires (Wolff, Malone et al. 1990) ou attaché à des particules d'or bombardées au niveau du tissu (Cheng, Ziegelhoffer et al. 1993). Bien que ces techniques soient rarement efficaces, elles peuvent parfois conduire à une faible expression prolongée du transgène, notamment via l'activité d'une transposase exogène dont le gène est exprimé de façon transitoire (Hackett, Ekker et al. 2005).

Nanoparticules : Les méthodes utilisées pour la vectorisation de l'ADN sont identiques à celles exposées précédemment pour le transport de molécules, la seule condition étant que l'ADN soit inclus en milieu aqueux dans les nanoparticules ciblées qui vont délivrer leur contenu dans la cellule. Des cyclodextrines modifiées (Bellocq, Pun et al. 2003 ; Hu-Lieskovan, Heidel et al. 2005), des nanoparticules de PEG (Jabr-Milane, van Vlerken et al. 2008), des liposomes (Shen 2008) ont par exemple été utilisés pour délivrer de façon ciblée des plasmides ou des ARN interférents. Le problème de ces techniques n'est pas tellement la délivrance en elle-même, souvent correcte, mais le fait que l'ADN une fois dans le lysosome ou l'endosome, celui-ci est détruit par l'environnement acide ou par une nucléase. Les nanoparticules sont donc plutôt indiquées dans la délivrance cytoplasmique, plus simple, d'ARN interférents.

La thérapie génique représente un espoir de nouvelles thérapies, notamment contre le cancer, depuis de nombreuses années. L'utilisation de ce type de thérapie en combinaison avec des approches classiques a également apporté certains bénéfices. Mais les problèmes rencontrés lors de la mise en place de ces approches, notamment les problèmes de vectorisation et de réaction immunitaires liés aux vecteurs, ont souvent diminué l'efficacité des thérapies. L'arrivée des nouveaux vecteurs nanoparticulaires, à l'avenir multifonctionnels (Figure 35), et des méthodes utilisant l'ARN interférent représente donc un réel progrès pour l'amélioration de cette thérapie génique.

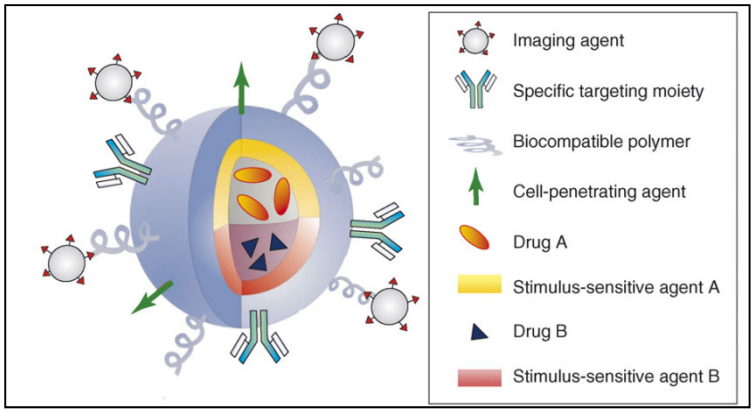


Figure 35. Nanoparticule multifonctionnelle (Sanvicens and Marco 2008)

2.7. Thérapie enzyme-prodrogue

2.7.1. Introduction

Le terme "prodrogue" a été employé pour la première fois en 1958 (Albert 1958) pour désigner des dérivés chimiques inactifs pharmacologiquement qui pouvaient être utilisés pour altérer les propriétés physico-chimiques de drogues, de manière temporaire, afin d'augmenter leur efficacité et/ou diminuer la toxicité associée. Le principe de base repose sur la délivrance d'un enzyme ou de son gène dans la cellule, convertissant ensuite un produit non toxique par lui-même en une substance cytotoxique. L'activation de cette prodrogue par un enzyme situé dans un organe ou un tissu particulier permet ainsi de cibler l'action de la drogue et de diminuer les doses administrées pour obtenir un effet identique, voire meilleur. Au début, ce sont les caractéristiques uniques de chaque tissu qui sont utilisées. En 1978, par exemple, des dérivés gamma-glutamyl de la dopamine sont synthétisés afin d'être spécifiquement activés en drogue vasodilatatrice par des enzymes fortement exprimés dans le rein : la gamma-glutamyl transpeptidase et la L-acide aminé aromatique décarboxylase. La concentration élevée de drogue obtenue dans le rein a atteint le seuil nécessaire pour un effet thérapeutique sans toucher d'autres organes (Wilk, Mizoguchi et al. 1978 ; Mizoguchi, Orlowski et al. 1979). Ce concept a été ensuite repris, notamment pour le traitement du cancer, en augmentant cette fois l'activité cytotoxique d'une drogue à un endroit précis.

2.7.2. Thérapie enzyme-prodrogue : application en cancérologie

Cette thérapie s'effectue le plus souvent en deux phases. Lors de la première phase, l'enzyme ou son gène activant la prodrogue est dirigée vers les cellules. Dans un deuxième temps, la prodrogue non toxique, substrat de l'enzyme exogène, est administrée localement ou de façon systémique (Springer and Niculescu-Duvaz 2000). Même une administration systémique de la prodrogue peut être convertie en hautes concentrations de produit actif localement. Afin d'être cliniquement viable, à la fois l'enzyme et le substrat utilisé doivent posséder certaines caractéristiques. Les enzymes peuvent être d'origine non-humaine ou des protéines humaines qui sont absentes ou exprimées à un faible niveau dans les tissus normaux (Rigg and Sikora 1997). La protéine doit être correctement acheminée, ou son gène correctement exprimé, au tissu concerné et doit posséder une haute activité catalytique. La prodrogue doit être un bon substrat pour l'enzyme mais doit être peu ou pas activée par des enzymes endogènes hors du tissu traité. Dans le cas de la transduction d'un gène, la prodrogue doit être capable de traverser la membrane pour subir une activation intracellulaire, où le produit actif est formé. La drogue doit être très cytotoxique alors que la prodrogue doit être très faiblement toxique.

Actuellement, il existe 4 méthodes de délivrance possibles pour l'enzyme (Figure 36) :

- Délivrance de l'enzyme dans les cellules tumorales par une thérapie enzyme-prodrogue dirigée par la lectine (***LEAPT***) : cette approche est basée sur la liaison entre les lectines, récepteurs membranaires, et leurs ligands carbohydrates (Weis and Drickamer 1996). En effet, le récepteur des asiaglycoprotéines est une lectine, trouvée à la membrane des hépatocytes, qui a déjà été utilisée pour délivrer des enzymes dans les cellules (Davis and Robinson 2002), *via* son internalisation après la reconnaissance de son ligand.
- Délivrance de l'enzyme actif à la surface des cellules tumorales par thérapie enzyme-prodrogue dirigée par un anticorps (***ADEPT***) : un anticorps monoclonal associé à un type cellulaire est lié à un enzyme, capable de fonctionner à l'extérieur de la cellule, activant une prodrogue afin de former un complexe qui, une fois administré, se fixe sur la membrane cellulaire et active à un endroit ciblé la prodrogue en produit cytotoxique (Syrigos and Epenetos 1999). Les drogues adéquates produites par l'ADEPT sont de petites molécules qui peuvent diffuser à travers les membranes des cellules tumorales une fois métabolisées, pénétrant ainsi les cellules possédant l'anticorps mais aussi leurs voisines (Stribbling, Martin et al. 1997).

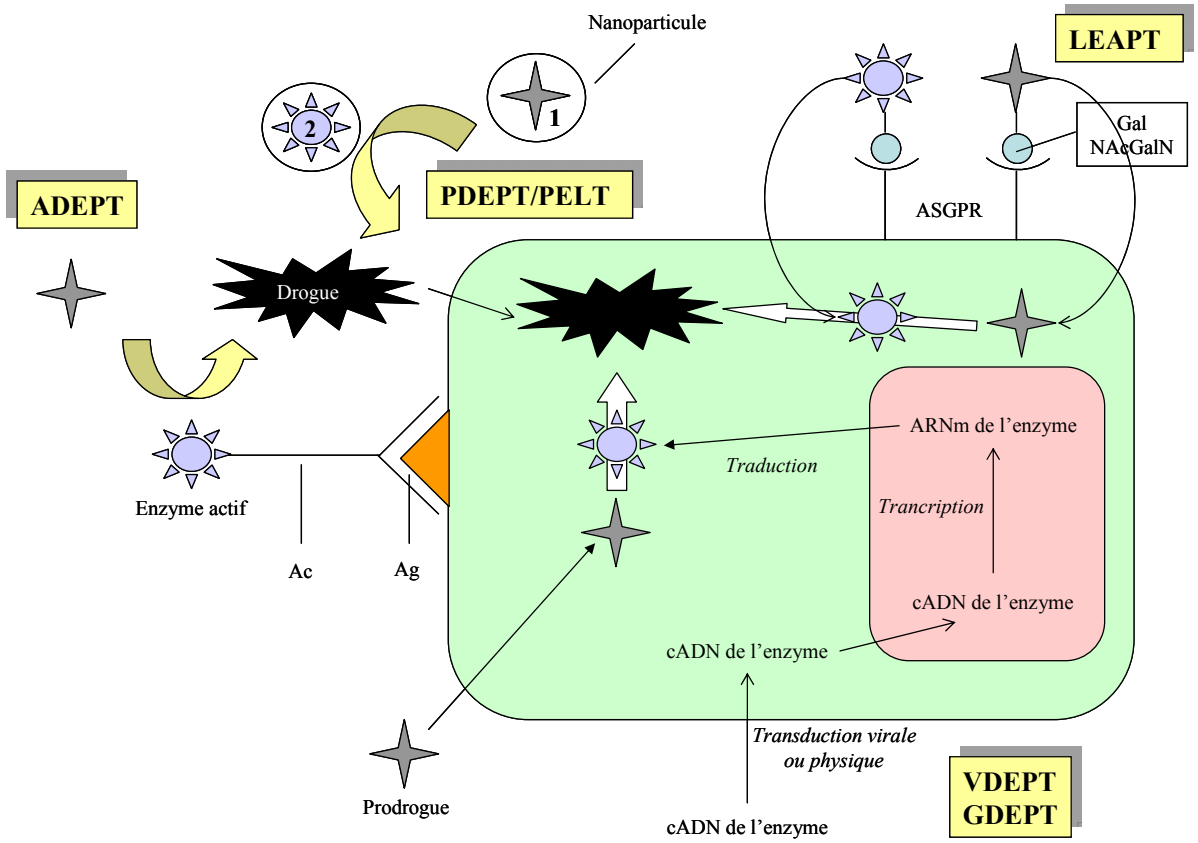


Figure 36. Aperçu général des approches de thérapie enzyme – prodrogue. Le nom de ces approches est indiqué dans les rectangles jaunes. Ac=anticorps ; Ag=antigène ; Gal=galactose ; NAcGalN=N-Acetyl Galactosamine ; ASGPR=récepteur asialglycoprotéine

- Délivrance de l'enzyme dans l'espace interstitiel à la périphérie des cellules tumorales par une thérapie enzyme-prodrogue dirigée par un polymère (***PDEPT***) ou par une thérapie liposome enzyme-polymère (***PELT***) : basées sur le ciblage de nanoparticules vers une tumeur par l'effet EPR (Duncan, Gac-Breton et al. 2001), la prodrogue étant ici administrée avant l'enzyme activateur. La co-localisation finale de la prodrogue avec l'enzyme permet la production de drogue à proximité des tumeurs.
- Délivrance du gène de l'enzyme dans les cellules tumorales ciblées par thérapie génique enzyme-prodrogue (***GDEPT***) ou par un virus (***VDEPT***). La GDEPT, connue aussi sous le nom de thérapie du gène suicide ou GPAT (thérapie génétique d'activation de prodrogue) (Eaton, Perry et al. 2001), est une technique impliquant la délivrance d'un gène codant pour une enzyme exogène dans un type de cellule particulier, où une prodrogue non toxique administrée de façon systémique peut être activée après expression de l'enzyme, induisant une cytotoxicité. La VDEPT est une variante de la GDEPT qui utilise spécifiquement des vecteurs viraux pour l'introduction du gène codant pour l'enzyme.

2.7.3. GDEPT

Exemple : Le concept de GDEPT a été proposé pour la première fois en 1986 (Moolten 1986). Cette première thérapie (et la plus courante) est celle utilisant la thymidine kinase du virus herpes simplex (HSV-tk) couplé au Ganciclovir (GCV), qui a été étudiée de façon extensive dans le cadre du mésothéliome malin (Smythe 2002). Après la délivrance du gène de la thymidine kinase dans les cellules, celles-ci sont traitées par du ganciclovir, qui n'est phosphorylé que par la HSV-tk en un analogue de purine qui inhibe la synthèse d'ADN, conduisant à une cytotoxicité (Smythe, Hwang et al. 1995).

Effet de proximité : L'effet de proximité ou effet « bystander »peut être défini comme l'effet cytotoxique sur des cellules non transformées par le gène suicide après l'administration de la prodrogue, lorsque seule une fraction de la masse tumorale a été transfectée (Huber, Austin et al. 1994). A cause de la faible efficacité de transduction/infection du gène/du vecteur dans la GDEPT, cet effet est très important pour le succès de cette thérapie. Plusieurs types d'hypothèses ont été proposées afin d'expliquer cet effet *in vivo* et *in vitro.*

Les métabolites toxiques des prodrogues activées lors de la GDEPT peuvent être libérés de cellules mortes ou mourantes et sont capables de diffuser passivement à travers les membranes des cellules tumorales avoisinantes. Ce mécanisme est à priori responsable des effets de proximité observés dans la majorité des systèmes GDEPT, tels que la formation de 5-FU à partir de 5-FC (Huber, Austin et al. 1994) (Kievit, Nyati et al. 2000), la présence de métabolites actifs du cyclophosphamide (Waxman, Chen et al. 1999) ou la réduction de la dinitrobenzamide CB1954 en agent alkylant par la nitroréductase d'*E.coli* (Anlezark, Melton et al. 1995). La caractéristique la plus intéressante d'un tel mécanisme est que le contact intercellulaire n'est pas requis pour la cytotoxicité des cellules non transfectées.

Pour les prodrogues nucléosidiques, l'effet de proximité est différent, les métabolites phosphorylés ne pouvant diffuser à travers les membranes. Le système HSV-tk/ganciclovir, par exemple, requiert un contact intercellulaire et le transfert de métabolites s'effectue via les communications intercellulaires par les canaux jonctionnels "gap" (GJIC) (Mesnil and Yamasaki 2000). Malgré tout il existe quelques exceptions suggérant que l'effet de proximité n'est pas entièrement médié par les canaux jonctionnels, même si le contact intracellulaire est requis (Imaizumi, Hasegawa et al. 1998).

Immunogénicité du gène transfecté: Ces types d'effet de proximité ont été observés *in vivo* et généralement il existe une relation entre les caractéristiques observées *in vivo* et celles observées *in vitro* (Niculescu-Duvaz and Springer 2005). Mais *in vivo*, l'effet de proximité peut être augmenté par les réactions immunes collatérales. En effet, bien que l'effet de proximité ait été observé chez des animaux immunocompromis, les données suggèrent que l'effet de proximité *in vivo* est largement médié par la libération de cytokines, ainsi cet effet est plus important chez des animaux immunocompétents (Ramesh, Marrogi et al. 1996). L'existence d'un effet de proximité "distal", où des tumeurs anatomiquement séparées, ne pouvant avoir aucune coopération métabolique, étaient inhibées par la même GDEPT administrée à une seule des tumeurs, ont confirmé cette hypothèse (Eaton, Perry et al. 2001) ; (Agard, Ligeza et al. 2001). Ces études montrent qu'un effet de proximité distal est le résultat d'une réponse immunitaire puisque les modèles de GDEPT utilisés étaient la combinaison HSV-tk/ganciclovir, dont les métabolites ne peuvent diffuser librement. Une autre preuve de cet effet distal est donnée par la cotransfection de gènes suicides avec des gènes augmentant la réponse immunitaire, ce qui s'est révélé plus efficace pour la thérapie que des gènes suicide seuls (Lee, Piao et al. 2004). Cette immunité serait apparemment à médiation cellulaire, la présence d'interféron indiquant l'intervention de lymphocytes T (Eaton, Perry et al. 2001). Celle-ci serait donc déclenchée par la présentation de peptides issus de la protéine issue du gène enzymatique transfecté. Il a également été suggéré que quelques produits actifs libérés durant la GDEPT *in vivo* pouvait produire une nécrose tumorale et une réponse inflammatoire, ce qui peut déclencher une réaction immunitaire (Mullen, Anderson et al. 1998).

Mais les bénéfices tirés de ce mécanisme immunitaire présente également des revers. Si le gène transfecté déclenche la production d'une protéine exogène, alors la réaction immunitaire déclenchée induira la destruction des cellules transfectées. Ceci n'est pas un désavantage en soi, la cytotoxicité sur les cellules tumorales étant l'effet recherché. Mais l'élimination des cellules transfectées induit l'arrêt rapide de la métabolisation de la prodrogue, éliminant alors les avantages de l'effet de proximité classique (Roy and Waxman 2006). De plus, l'éventuelle production d'anticorps peut entraîner la production de complexes immuns, pouvant déclencher certains effets secondaires indésirables. Si la protéine exprimée à partir du transgène est une chimère entre des protéines exogènes et endogènes, alors la production d'anticorps autoimmuns n'est pas à exclure.

Utilisation des P450s : comme nous l'avons vu, la majorité des P450s métabolisant des médicaments l'effectuent principalement dans un but de détoxification. Malgré tout, il existe certaines prodrogues inactives qui sont métabolisées, par l'action d'un P450, en drogue cytotoxique.

Mais il existe plusieurs limitations à utiliser telles quelles des prodrogues métabolisées par des P450s. En effet, comme il a été exposé précédemment, le métabolisme assuré par des P450s peut être très variable inter-individuellement. De plus, les P450s sont largement distribués dans tout l'organisme, ce qui peut créer des effets secondaires ou de premier passage importants. Le fait qu'il existe aussi de nombreuses interactions médicamenteuses au niveau du P450 est également un désavantage. C'est pour cela que des GDEPT ont été développées pour des prodrogues activées par le P450, permettant un meilleur ciblage du traitement.

Utilisation des oxazaphosphorines : ce sont les prodrogues les plus étudiées actuellement dans le cadre d'une GDEPT impliquant les P450s, comme la cyclophosphamide (CPA) et son isomère l'ifosfamide. Ces prodrogues sont activées en agents alkylants par plusieurs P450s humains. L'ifosfamide (IFA) est activée chez l'humain par une 4-hydroxylation via le CYP3A4 avec une contribution mineure des CYP2A6, 2B6, 3A5, et 2C9/18/19 et est désactivée par N-dechloroethylation via le CYP3A4 et le CYP2B6 (Della Morte, Belisario et al. 1986 ; Roy, Yu et al. 1999 ; Boddy and Yule 2000). Mais cette prodrogue a montré une forte toxicité rénale, contrairement au cyclophosphamide, plus fortement métabolisé par 4-hydroxylation (Woodland, Ito et al. 2000). Cette toxicité a donc été attribuée à la plus forte production de chloroacetaldehyde à partir de l'IFA que de la CPA. De plus, il a été observé que des microsomes hépatiques humains de femmes catalysaient une N-dechloroethylation de l'ifosfamide plus rapidement que ceux d'hommes, induisant un plus haut risque de toxicité rénale et cérébrale chez les patientes (Schmidt, Baumann et al. 2001). Pour toutes ces raisons, c'est la CPA qui a été retenue pour la GDEPT, ce qui sera détaillé dans les paragraphes suivants.

Les méthodes de délivrance ciblée au niveau des tumeurs d'un enzyme et d'une prodrogue inactive rendue cytotoxique par celui-ci a permis d'améliorer l'efficacité et de diminuer les effets secondaires de traitement anticancéreux et réduisant les doses administrées. Il existe plusieurs manières de délivrer l'enzyme, son gène ou la prodrogue de façon séquentielle, en utilisant des vecteurs tels que des vecteurs viraux, des anticorps ou des récepteurs membranaires spécifiques. Si certains problèmes, de vectorisation notamment, sont évités grâce à de nouvelles technologies, ce type de thérapie est très prometteur.

2.7.4. Cyclophosphamide

2.7.4.1. Présentation

La Food and Drug Administration a attesté l'autorisation de mise sur le marché de la cyclophosphamide (CPA) en 1959, sous le nom commercial de "Cytoxan" et "Neosar" (Endoxan en France). La CPA est un agent alkylant bifonctionnel de type moutarde azotée et possède une activité pharmacologique envers de nombreux cancers tels que le lymphome non hodgkinien, le lymphome de Burkitt, le myélome multiple, les leucémies lymphoïdes et myéloïdes chroniques, le cancer de l'ovaire, du sein et du poumon, le neuroblastome et le rétinoblastome (http://www.biam2.org/www /Sub830.html#SubIndic) (Fleming 1997).

La CPA a aussi été utilisé pour son activité néoplasique pour traiter des syndromes immunitaires tels que le lupus érythémateux aigu disséminé, l'arthrite rhumatoïde, la granulomatose de Wegener ou dans la greffe d'organe. La CPA cause des lymphopénies (à la fois pour les cellules T et B) et la suppression sélective de l'activité des lymphocytes B. La prodrogue fait également partie de protocoles de chimiothérapie combinée :

- CMF (Cyclophosphamide, methotrexate et 5-fluorouracile) pour le cancer du sein
- CAF (cyclophosphamide, doxorubicine et 5-fluorouracile) pour le cancer du sein
- CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) pour les lymphomes

2.7.4.2. Pharmacocinétique

La demi-vie de la CPA est d'environ 8 heures (de 3 à 10 heures), mais la demi-vie du métabolite est d'environ 1 à 5 heures (Boddy and Yule 2000). La CPA semble induire son propre métabolisme, avec une clairance plus rapide associé à un régime d'administration de plusieurs jours. Environ 10 à 20% de la dose totale est éliminée sous forme inchangée par voie rénale mais ceci peut être variable. Même si le rein excrète de la CPA, celle-ci est également activement réabsorbée, le métabolisme hépatique étant la voie principale d'élimination. La plupart des métabolites (80% de 4-ketocyclophosphamide et de carboxyphosphamide) sont éliminés de façon rénale (Boddy and Yule 2000). La distribution de la CPA et des ses métabolites a été observée dans le liquide céphalo-rachidien de patients pédiatriques, ce qui a permis de voir que la prodrogue et ses métabolites passaient la barrière hémato-encéphalique et possédaient une concentration cérébrale identique à la concentration sanguine détectée (Yule, Price et al. 1997).

2.7.4.3. Métabolisme

La CPA est une prodrogue non toxique qui nécessite une activation hépatique pour devenir cytotoxique (Figure 37). La première phase du métabolisme est la transformation de la CPA en 4-hydroxycyclophosphamide (4-OH CPA) par des P450s, majoritairement le CYP2B6 mais aussi par les CYP2C9, 2C18 et 3A4 dans une moindre mesure (Roy, Yu et al. 1999). Ce métabolite et son tautomère acyclique, l'aldophosphamide, rejoignent ensuite la circulation sanguine par laquelle ils atteignent éventuellement d'autres tissus incluant les cellules tumorales cibles où ils se décomposent spontanément pour donner l'acroléine et la moutarde phosphoramide. Même si la moutarde phosphoramide est également produite de manière extracellulaire, ce composé est très polaire et pénètre difficilement les cellules. La phosphoramide moutarde plasmatique joue probablement un rôle mineur dans les effets thérapeutiques et toxiques de la CPA. Ainsi, le couple 4-OH CPA / aldophosphamide sert efficacement de mécanisme de délivrance de la moutarde phosphoramide alkylante dans les cellules.

La moutarde phosphoramide est l'entité alkylante responsable des effets cytotoxiques (Figure 38) (Sladek 1988). Comme pour les autres agents alkylants bifonctionnels, la moutarde phosphoramide formes des ponts inter- et intra-brin dans l'ADN, en partie responsable de la mort cellulaire (Hilton 1984; Skare and Schrotel 1984).

Les ponts inter-brins se produisent le plus souvent au niveau de l'azote 7 de la guanine même si d'autres réactions se produisent dans une moindre mesure (Maccubbin, Caballes et al. 1991). L'acroléine se fixe aux protéines mais ne contribuent pas aux effets antitumoraux. Ce composé est toxique pour la vessie lors de son élimination urinaire, et associé au développement de cystites hémorragiques, entraînant un traitement des effets secondaires par le 2-mercaptoethane sulfonate (Mesna), qui se fixe à l'acroléine (Korkmaz, Topal et al. 2007).

La toxicité induite par la CPA déclenche des mécanismes d'apoptose dépendant de la caspase 9 tels que la fragmentation de l'ADN et l'activation par la poly(ADP)-ribose polymérase (PARP) (Schwartz and Waxman 2001). L'ifosfamide, un isomère de la CPA, a été observé comme étant responsable de nécrose cellulaire avec des signes caractéristiques tels que l'augmentation du volume cellulaire, la formation de vacuoles ou la fragmentation nucléaire (Karle, Muller et al. 1998).

D'autres enzymes sont également impliquées dans le métabolisme de la CPA (Sladek 1988), telles que des glutathion-S-transférases (GST) (Colvin, Russo et al. 1988) ou des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) (Sreerama and Sladek 1994). En effet, quelques formes d'ALDH catalysent l'oxydation de l'aldophosphamide en carboxyphosphamide, court-circuitant la production de moutarde phosphoramide et induisant une détoxification de la CPA. La carboxyphosphamide est excrétée dans les urines et compte pour environ 80% des métabolites (Voelcker and Haeglsperger 1982).

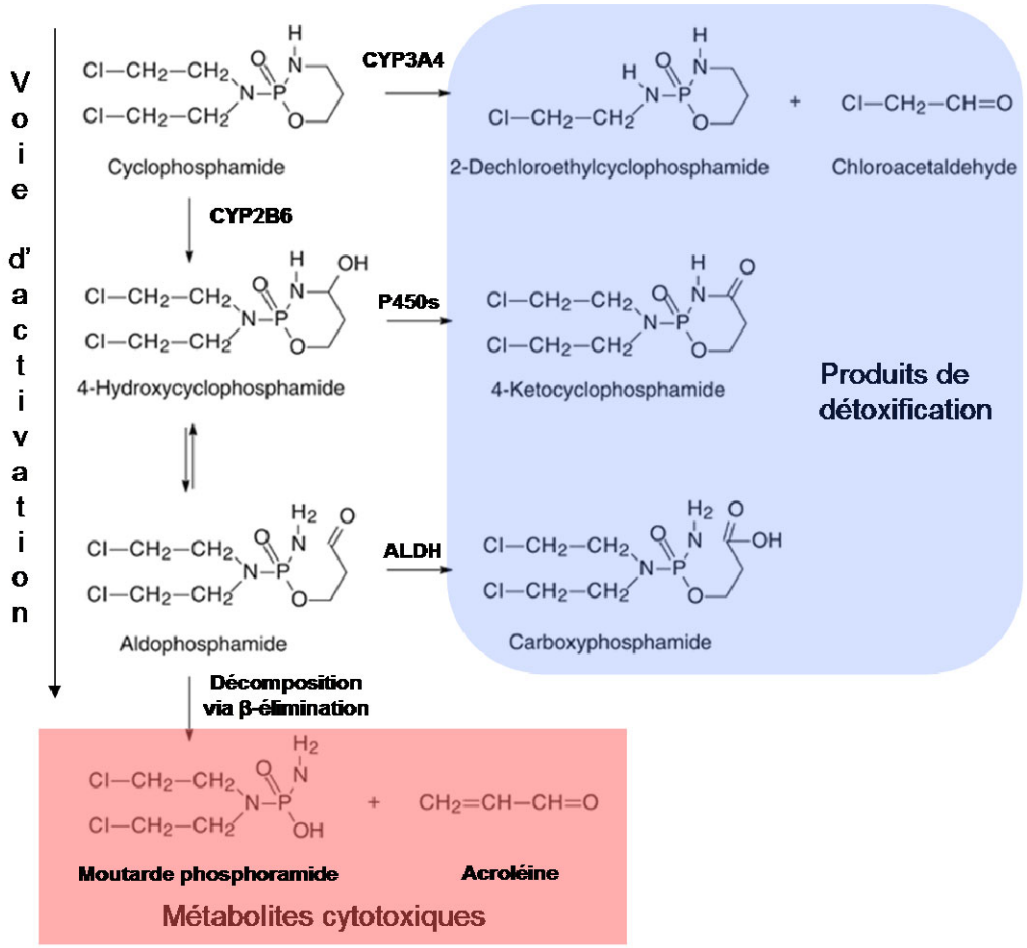


Figure 37. Métabolisme de la cyclophosphamide (ALDH = aldéhyde déshydrogénase)

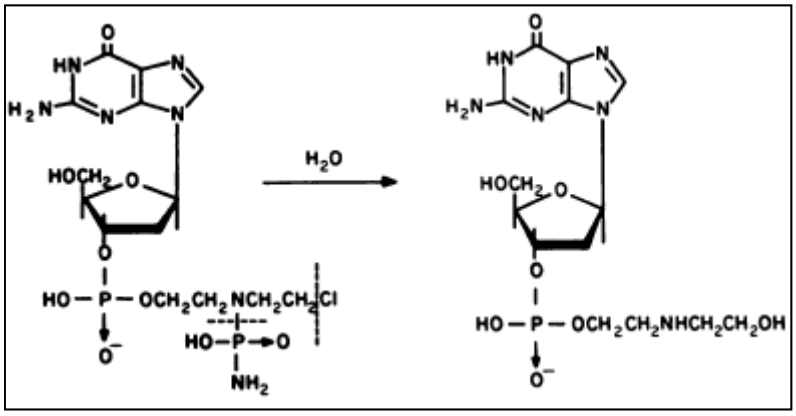


Figure 38. Alkylation du groupement phosphate de la 2'-deoxyguanosine 3'-monophosphate (dG3'P) par la moutarde phosphoramide et hydrolyse spontanée des liaison P-N et C-Cl, engendrant la 2'-deoxyguanosine 3'-phosphate 2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl dGuo3'P (Maccubbin, Caballes et al. 1991).

La forme d'ALDH principale intervenant dans ce mécanisme est l'ALDH1A1 (Sladek 1999 ; Vasiliou, Pappa et al. 2000) même s'il a été prouvé que l'ALDH3 joue également un rôle dans le métabolisme de l'aldophosphamide (Giorgianni, Bridson et al. 2000). Les GST semblent être à l'origine de deux types de conjugués glutothionyl décrits impliqués dans la détoxification de la CPA (Yuan, Smith et al. 1991). L'isoforme de GST principale catalysant ces réactions est la GST-1A1 (Dirven, van Ommen et al. 1994). Toutes les enzymes ayant été décrites dans ce paragraphe sont sujettes au polymorphisme, induisant des réactions variables au traitement (Ekhart, Rodenhuis et al. 2008). Pour la GDEPT impliquant la CPA et un P450 la métabolisant, le CYP2B6 a été choisi. En effet, les autres CYPs impliqués métabolisent plus faiblement la CPA. De plus, CYP3A4 a été détecté comme fortement impliqué dans la voie de détoxification de la CPA et sa forte expression ainsi que la quantité de composés qu'il métabolise en fait un mauvais candidat pour une activation ciblée de la prodrogue. Le CYP2B6 est exprimé plus faiblement et son efficacité a été prouvée lors d'une GDEPT effectuée *in vitro* (Jounaidi, Hecht et al. 1998).

2.7.5. CYP2B6

2.7.5.1. Généralités

Un gène (CYP2B6) et un pseudogène (CYP2B7P) de la famille CYP2B ont été détectés chez l'humain. Il existe un épissage alternatif du gène du CYP2B6 (Miles, McLaren et al. 1990) ainsi qu'un transcrit avec un codon stop prématuré issu du pseudogène (Yamano, Nhamburo et al. 1989). Le gène du CYP2B6 est localisé dans le groupe de gènes CYP2A-2B-2F du chromosome 19 (Hoffman, Fernandez-Salguero et al. 1995). Le CYP2B6 ne représente que 1 à 2% du total des P450s hépatiques (Mimura, Baba et al. 1993 ; Gervot, Rochat et al. 1999). Son expression semble régulée spécifiquement selon les tissus, car dans les poumons et dans les reins il est exprimé en tant que variant d'épissage fonctionnel (Czerwinski, McLemore et al. 1994 ; Nelson, Koymans et al. 1996), présentant un codon stop prématuré (Stubbins, Harries et al. 1996). Le développement d'anticorps monoclonaux inhibiteurs (Yang, Krausz et al. 1998), d'anticorps polyclonaux (Gervot, Rochat et al. 1999) et d'anticorps polyclonaux monospécifiques (Stresser and Kupfer 1999) a permis de détecter le CYP2B6 dans différents spécimens de foie et d'observer une variabilité interindividuelle d'expression allant jusqu'à 100 fois (Code, Crespi et al. 1997 ; Edwards, Adams et al. 1998; Gervot, Rochat et al. 1999).

2.7.5.2. Substrats

Malgré sa faible représentation dans le foie, le CYP2B6 métabolise un nombre important de substrats, médicamenteux ou pas, de structures diverses, pour lesquels il possède une affinité qui peut différer de 4 ordres de magnitude (Ekins, Iyer et al. 2008). Le CYP2B6 possède environ 75% d'identité avec les autres membres de la famille 2B mais présente certaines spécificités de substrat particulières.

Par exemple, il hydroxyle la testostérone et l'androstènedione à des taux beaucoup plus faibles que les autres membres de la famille 2B, mais il est le seul à hydroxyler le RP73401, un puissant inhibiteur de la phosphodiestérase de nucléotide cyclique de type IV (Stevens, White et al. 1997; Domanski, Schultz et al. 1999). Une étude de mutagenèse dirigée remplaçant tous les acides aminés uniques des SRS du CYP2B6 par les acides aminés correspondants du CYP2B1, un SRS après l'autre, n'a pas abouti à la métabolisation de l'androstènedione par les mutants, prouvant qu'une combinaison de mutations dans plusieurs SRS ou des mutations hors du SRS étaient nécessaires pour conférer cette activité au CYP2B6 (Domanski, Schultz et al. 1999).

2.7.6. Utilisation du couple CYP2B/oxazaphosphorines pour une GDEPT

2.7.6.1. Présentation

L'utilisation des CYP2B pour métaboliser les oxazaphosphorines CPA ou IFA dans le cadre d'une GDEPT se base sur l'hypothèse de l'amélioration des bénéfices thérapeutiques apportés par cette thérapie par rapport à une chimiothérapie classique (Figure 39).

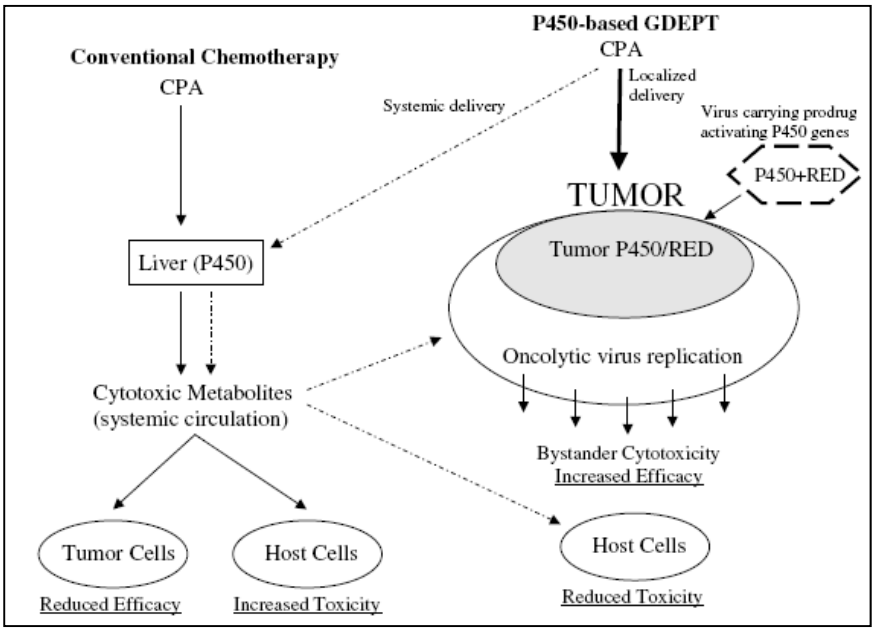


Figure 39. Bénéfices thérapeutiques apportés par la GDEPT basée sur les P450s par rapport à une chimiothérapie conventionnelle. RED, P450 réductase (Roy and Waxman 2006).

La première tentative de GDEPT fut menée en 1994 par l'équipe de Waxman en transfectant le gène du CYP2B1 de rat dans des cellules de gliome, augmentant leur sensibilisation à la CPA (Wei, Tamiya et al. 1994 ; Chen and Waxman 1995). Les résultats ont ensuite été confirmés lorsque l'expression du CYP2B1 dans des cellules 9L implantées dans le cerveau de souris a significativement amélioré la survie des animaux, même lorsque la CPA était administrée de façon systémique (Manome, Wen et al. 1996). Ensuite, l'utilisation de gènes de P450s humains pour l'activation de la CPA a permis un meilleur développement clinique de cette stratégie, l'utilisation de gènes humains diminuant les complications

associées aux réponses immunitaires associées à l'utilisation de gènes non humains (Roy and Waxman 2006). De plus, les prodrogues utilisées sont largement utilisées en clinique et leurs propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques sont connues.

Le CYP2B6 a ensuite été choisi, en combinaison avec la CPA, pour cette approche thérapeutique (Jounaidi, Hecht et al. 1998). De plus, les métabolites de la CPA montrent un fort effet de proximité ne requérant pas de contacts intercellulaires et présent même si seulement 10% des cellules ont été transfectées (Chen and Waxman 1995). En effet, le métabolite hydroxylé, l'aldophosphamide voire même la chloroacétaldéhyde et l'acroléine circulant facilement entre les cellules (Roy and Waxman 2006). Et même si la cytotoxicité tumorale manifeste induite par la CPA activée par les P450s est relativement longue (2 à 3 jours) (Schwartz and Waxman 2001), les cellules transfectées entrent en apoptose (Schwartz, Chen et al. 2003).

2.7.6.2. Essais cliniques

Dans un essai clinique de phase I/II mené en Allemagne, 14 patients présentant des tumeurs inopérables du pancréas ont été traités avec des cellules exprimant du CYP2B1, injectées directement au niveau des vaisseaux conduisant à la tumeur puis traités avec de l'ifosfamide (Lohr, Hoffmeyer et al. 2001 ; Salmons, Lohr et al. 2003). Le protocole de traitement a été bien toléré et relativement efficace, avec quelques rémissions partielles et une meilleure survie. Ces données prometteuses posent la base d'autres essais de plus grande importance.

Un autre essai, sponsorisé par la société Oxford BioMedica, a utilisé un vecteur rétroviral contenant le gène du CYP2B6, appelé MetXia (Kan, Griffiths et al. 2001). Les résultats de la phase I/II de l'essai clinique initial concernant des patients avec des cancers du sein avancés et des mélanomes ont indiqués que le produit était bien toléré et la délivrance du gène a été observée dans les tumeurs traitées (Hunt 2001) De plus, un bénéfice clinique associé avec une réponse immunitaire anti-tumorale apparente a été observée chez certains patients (Kan, Kingsman et al. 2002 ; Braybrooke, Slade et al. 2005). Si cet effet immunitaire est confirmé, MetXia peut être potentiellement utile pour le traitement d'un vaste panel de tumeurs solides, voire de métastases disséminées. Un essai clinique de phase I/II a suivi, confirmant l'innocuité et l'activité immunitaire anti-tumorale de l'essai initial, établissant une preuve de concept de cette approche (Roy and Waxman 2006).

2.7.6.3. Amélioration de la GDEPT CYP2B/CPA

Utilisation de la NADPH réductase : Les études initiales de GDEPT avec les P450s étaient basées sur l'hypothèse que le transfert du gène de la P450 réductase (CPR) avec celui du P450 n'était pas nécessaire puisque la CPR est exprimée dans presque tous les types cellulaires mammifères, incluant des cellules tumorales humaines (Yu, Matias et al. 2001).

Des études plus récentes ont en fait révélé que la surexpression de la CPR conduit à une augmentation substantielle de la sensibilité à la CPA, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Chen, Yu et al. 1997). Dans des cellules 9L de gliosarcome de rat transduites avec le cDNA du CYP2B1 de rat (Chen, Yu et al. 1997) ou de CYP2B6 humain (Jounaidi, Hecht et al. 1998), l'activité métabolique des P450s et la cytotoxicité associée sont augmentées substantiellement avec une co-expression de la CPR. La CPR augmente la production et la libération de métabolites activés du CPA, induisant un effet de proximité plus important et tuant de 50 à 100 fois plus de cellules (Chen, Yu et al. 1997). L'efficacité de cette co-expression semble la plus forte lorsque les cDNA du P450 et de la CPR sont exprimés ensemble dans un ARNm bicistronique, liés par un signal d'entrée interne au ribosome, permettant au virus de détourner le ribosome humain à son profit (Jounaidi and Waxman 2004). Les séquences du P450 et de la CPR peuvent aussi être exprimées en tant que séquence codante unique qui génère une protéine P450-CPR fusion (Tychopoulos, Corcos et al. 2005).

Utilisation de facteurs anti-apoptotiques : Des études récentes ont montré que l'utilisation de facteurs anti-apoptotiques pouvait être couplée à une GDEPT basée sur les P450s, ceci prolongeant la longévité des cellules tumorales activant la prodrogue. En particulier, l'expression rétrovirale de l'inhibiteur de caspases p35 a été démontré comme retardant la mort des cellules exprimant le P450 traitées avec de la CPA, augmentant de fait l'effet de proximité. De plus, l'introduction de p35 retarde, sans bloquer totalement, la mort des cellules tumorales (Schwartz, Chen et al. 2002). L'inhibition de l'apoptose caspase dépendante peut également déclencher l'entrée des cellules en nécrose en réponse à la CPA, ce qui peut augmenter potentiellement l'effet de proximité distal basé sur le système (Waxman and Schwartz 2003).

Délivrance de la prodrogue : Une délivrance localisée de la prodrogue peut potentiellement être utilisée afin d'augmenter la spécificité tumorale de la GDEPT tout en minimisant la toxicité pour l'hôte. Lors d'une étude, un polymère à délivrance contrôlée chargé avec de la CPA a été implanté dans une tumeur solide sous-cutanée. Une augmentation de 250 fois du niveau intratumoral en métabolite hydroxylé 4-OH-CPA a été atteinte, en comparaison avec une administration intrapéritonéale (Ichikawa, Petros et al. 2001), avec une augmentation de l'effet anti-tumoral.

Dans une autre étude, l'horaire d'administration de la CPA a été démontré comme étant un déterminant critique de l'efficacité thérapeutique de la GDEPT. L'administration de la CPA selon un protocole métronomique de 6 jours a montré une forte réponse anti-angiogénique (Browder, Butterfield et al. 2000). L'application de ce protocole pour des tumeurs exprimant le CYP2B6 et la CPR a conduit à l'éradication à la fois de grosses et de petites tumeurs avec une toxicité minimale pour l'hôte (Jounaidi and Waxman 2001). Une régression tumorale, mais pas une éradication, avait été observée en utilisant ce même protocole avec des tumeurs déficientes en P450.

Délivrance du transgène : Dans les stratégies de VDEPT, les vecteurs viraux sont souvent délivrés par injection intratumorale mais d'autres méthodes ont été développées. Lors d'une approche, des cellules de rein de félin ont été transfectées avec un plasmide d'expression contenant le cDNA du CYP2B1, puis encapsulées dans des capsules de sulfate de cellulose, protégeant les cellules du système immunitaire (Lohr, Muller et al. 1998). Ces capsules contiennent jusqu'à 104 cellules et lors d'études de viabilité cellulaire dans la souris, 50 % des cellules étaient vivantes après 4 semaines d'encapsulation. Ces capsules ont ensuite été utilisées lors d'un essai clinique décrit précédemment (Lohr, Hoffmeyer et al. 2001).

Pour une autre étude, des macrophages ont été utilisés. En effet, les macrophages ont la capacité d'infiltrer les tumeurs, notamment dans les régions hypoxiques, ce qui peut en faire de bons vecteurs pour la délivrance du gène lors d'une GDEPT. Des macrophages ont donc été infectés avec des vecteurs exprimant le gène du CYP2B6 (Griffiths, Binley et al. 2000), le traitement des macrophages avec de la CPA n'affectant pas leur viabilité. Ces macrophages ont ensuite été inoculés dans des cellules tumorales en culture dans lesquelles ils se sont infiltrés, et le traitement ultérieur par la CPA a induit une réduction du volume tumoral. Le même phénomène s'est produit lorsque les macrophages étaient transfectés avec un vecteur dans lequel l'expression du gène du CYP2B6 était régulée par une région promotrice sensible à l'hypoxie.

Oncolyse virale : Pour potentialiser ces effets, la GDEPT peut être combinée avec la technique d'oncolyse virale, induisant une cytotoxicité supplémentaire pour les cellules. En effet, un gène de P450 peut être incorporé directement dans le génome d'un adénovirus réplicatif, permettant une transmission du transgène aux cellules tumorales, ou encore co-transfecté avec le virus réplicatif via un second adénovirus non réplicatif. Dans ce cas, le virus réplicatif facilite l'amplification et la propagation tumorale du virus non réplicatif (Jounaidi, Chen et al. 2006).

Un autre exemple est celui du virus oncolytique herpes simplex comportant le cDNA du CYP2B1 à la place du gène de la ribonucléotide réductase (Chase, Chung et al. 1998), qui montre une bonne activité dans des expériences précliniques de GDEPT quand il est utilisé en combinaison avec la CPA dans le traitement de gliomes, de carcinomes hépatocellulaires et de métastases (Aghi, Chou et al. 1999 ; Pawlik, Nakamura et al. 2000 ; Pawlik, Nakamura et al. 2002). De plus, le traitement par la CPA possède un effet minimal sur la réplication du virus, qui présente un haut degré de sélectivité tumorale et une efficacité thérapeutique améliorée (Pawlik, Nakamura et al. 2000).

Optimisation du P450 pour la métabolisation de la CPA :

Utilisation du CYP2B11 : Le CYP2B6 utilisé lors de la GDEPT est l'acteur majeur de l'activation de la CPA dans l'organisme mais il ne possède pour celle-ci qu'une faible affinité, le K_m étant de l'ordre du mM (Huang, Roy et al. 2000). Un moyen d'optimiser la GDEPT serait d'utiliser un enzyme possédant un K_m plus bas pour la CPA.

Or, le CYP2B11, une isoforme canine du CYP2B6, possède une affinité 30 fois meilleure que son homologue humain pour la CPA (Huang, Roy et al. 2000).

Deux GDEPT utilisant un rétrovirus contenant le cDNA du CYP2B11 séparé du gène de la P450 réductase (CPR) par un signal d'entrée interne au ribosome ou un adénovirus coexprimant les gènes du CYP2B11 et de la CPR ont donc été mises en place. Ces thérapies ont induit une cytotoxicité marquée de la CPA et un effet de proximité important, *in vivo* et *in vitro*, en combinaison avec la transfection d'un adénovirus oncolytique ONY-017 ou non, à des concentrations de l'ordre du µM, ce qui n'est pas le cas avec le CYP2B6. Chez la souris, un traitement métronomique par la CPA a amené à une régression totale des tumeurs et à une période sans rechute plus longue que celle observée avec des tumeurs transfectées avec le CYP2B6 (Jounaidi, Chen et al. 2006).

Lors d'une deuxième étude, l'efficacité de la GDEPT exploitant le CYP2B11 a été encore améliorée chez la souris en injectant la CPA de manière intratumorale et non intraveineuse, évitant ainsi un important effet de premier passage hépatique et augmentant la délivrance de la CPA dans les cellules. L'utilisation d'un polymère à libération contrôlée pour le transport de la CPA a également permis d'augmenter l'efficacité de cette stratégie (Chen, Jounaidi et al. 2007).

Même si cette approche présente des avantages thérapeutiques certains, le CYP2B11 est d'origine canine, ce qui présente un fort risque de réaction immunitaire lors de l'expression dans l'organisme.

Mutagenèse dirigée : L'autre stratégie d'optimisation du P450 pouvant être réalisée est la mutagenèse du CYP2B6 afin d'augmenter son affinité pour la CPA, tout en gardant une architecture proche de l'enzyme humaine pour déjouer le système immunitaire.

Dans ce but, plusieurs études de mutagenèse dirigée ont été menées afin de déterminer les acides aminés importants pour la spécificité de substrat du CYP2B6 en utilisant plusieurs substrats : le RP73401, l'androstènedione, la 7-ethoxytrifluorocoumarine (7-EFC) (Domanski, Schultz et al. 1999), la 7-ethoxycoumarine (7-EC) et la 7-butoxycoumarine (7-BC) (Spatzenegger, Liu et al. 2003). Le résumé des résultats obtenus est exposé en Figure 40.

S'inspirant de ces résultats, de modèles moléculaires du CYP2B6 à partir de la structure cristalline du CYP2B4, d'expériences d'amarrage de la CPA dans le site actif du CYP2B6 et de l'observation de l'affinité importante du CYP2B11 pour la CPA, l'équipe de De Waziers a construit une vingtaine de mutants uniques du CYP2B6, dont certains possèdent un K_m jusqu'à 4 fois inférieur à celui du CYP2B6 (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008). Les premières mutations effectuées ont consisté à déterminer trois acides aminés, tous hydrophobes, les plus proches du substrat dans le site actif et de les remplacer par des acides aminés soit plus polaires, soit de tailles différentes. En sus, après détermination de tous les acides aminés des SRS qui différaient entre le CYP2B6 et le CYP2B11, 6 mutants ont été construits en remplaçant dans chacun d'eux un acide aminé d'un SRS du CYP2B6 par celui lui correspondant dans le CYP2B11.

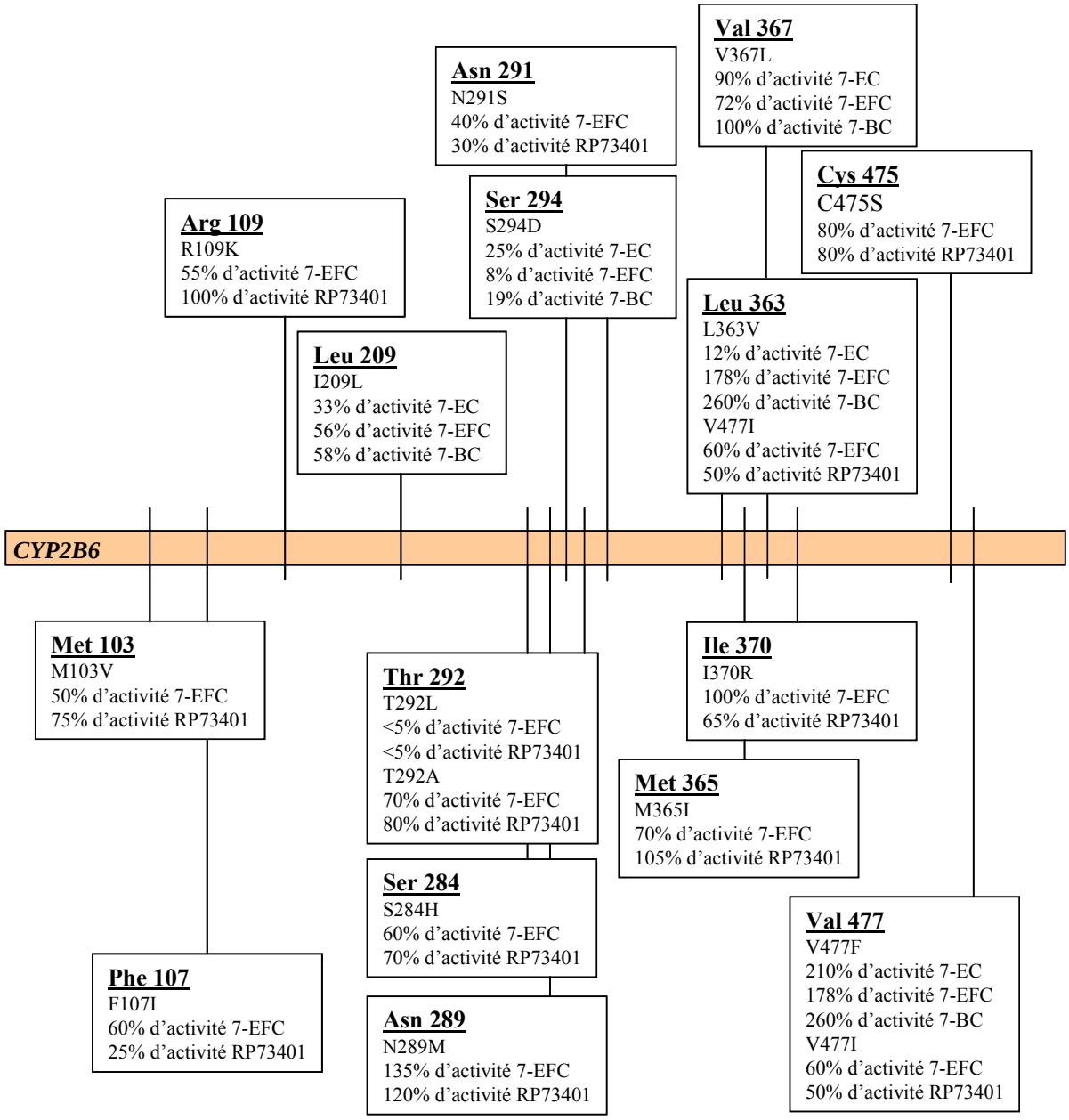


Figure 40. Etudes de mutagenèse dirigée sur le CYP2B6 (Tychopoulos 2005)

L'unique mutant réalisé à la position 114 (I114V) combine deux aspects puisqu'il a été modélisé comme se trouvant dans le site actif et qu'il diffère entre le CYP2B11 et le CYP2B6.

Les paramètres cinétiques des enzymes mutants ont été évalués pour l'hydroxylation de la CPA, après expression dans la levure (Tableau 3).

Tableau 3. Contenu en P450 et analyse cinétique de la 4-hydroxylation de la CPA dans des microsomes de levures exprimant le CYP2B6 sauvage et les mutants dirigés (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).

Mutation	P450 Content	V_{max}		K_m		V_{max}/K_m	
	pmol/mg	*mol/min/mol P450*	*% of wt*	*mM*	*% of wt*		*% of wt*
CYP2B6wt	112	62.5	100	4.9	100	12.8	100
Mutations in active site							
I114V	93	65.2	104	2.3	47	28.4	221
V367L	50	90.3	144	8.8	181	10.2	80
V367F	29	26.8	43	12.9	264	2.1	16
V367S	54	5.2	8	N.Q.			
V367T	30	24.2	39	6.4	131	3.8	30
V367H	17	1.5	2	N.Q.			
V477S	82	N.D		N.Q.			
V477T	76	37.2	59	8.9	182	4.2	33
V477Y	70	28.6	46	5.9	121	4.9	38
V477N	126	N.D		N.Q.			
V477D	53	2.5	4	N.Q.			
V477E	72	1.8	3	N.Q.			
V477I	53	77.4	124	3.2	66	24.2	189
V477F	104	81.1	130	3.3	68	24.5	191
V477W	203	99.9	160	2.8	57	35.7	278
G478A	75	28	45	6.3	129	4.4	35
G478V	81	36.3	58	2.6	53	14.2	110
G478S	139	7.5	12	N.Q.			
G478E	48	5.4	9	N.Q.			
Canine mutations							
F107V	180	95.9	153	6.5	133	14.8	115
L199M	70	125.2	200	4.8	98	26.3	205
S207A	90	69.9	112	5.5	113	12.7	99
K236N	40	47	75	56.2	1153	0.8	7
M365I	340	12.9	21	3.8	77	3.4	27
C475I	190	1.7	3	4.7	96	0.4	3
Double mutant							
I114V + V477W	120	58.5	94	1.1	23	52.7	411

N.Q., not quantifiable.

Les mutants V367S, V367T, V367H, V477S, V477T, V477Y, V477N, V477D, V477E, G478S et G478E, ont été réalisés afin de changer les acides aminés hydrophobes du site actif en acides aminés capables de créer des liaisons hydrogènes avec le substrat pour le stabiliser. Ceci n'a fait que diminuer l'activité de l'enzyme, montrant que l'hydrophobicité globale du site actif est nécessaire à une bonne activité.

Les mutants V477I, V477F et V477W ont été générés afin d'augmenter la taille de la chaîne latérale du résidu situé à cette position pour assurer une meilleure présentation du site d'hydroxylation à l'hème.

Le mutant V477F, déjà connu comme responsable de l'augmentation d'activité du CYP2B6 vis à vis de la 7-EFC, de la 7-EC et de la 7-BC (Domanski, Schultz et al. 1999 ; Spatzenegger, Liu et al. 2003), confère également au CYP2B6 une meilleure affinité et activité vis-à-vis de la CPA. De plus, plus la taille de la chaîne latérale est importante, plus le V_{max}/K_m est augmenté, culminant avec le mutant V477W. Les autres mutations montrent des résultats contrastés selon l'acide aminé considéré.

En ce qui concerne les mutations “canines”, seul le mutant L199M montre une réelle amélioration de l’activité catalytique, *a priori* grâce à une stabilisation d’un canal d’accès du substrat en remplaçant la leucine par une méthionine polaire capable d’établir une liaison hydrogène avec certains résidus environnants.

Le mutant mixte, à la fois canin et dans le site actif, I114V, présente une substantielle augmentation de l’affinité envers le CPA. Ceci est du au remplacement d’un acide aminé de taille importante par un plus petit au niveau d’un canal, permettant une meilleure entrée du substrat dans le site actif.

Le double mutant combinant les mutations présentant les meilleures améliorations d’activité (I114V et V477W) révèle effectivement la plus forte amélioration de l’affinité obtenue lors de cette étude. Mais il n’atteint pas encore l’affinité observée pour le CYP2B11 sauvage.

La thérapie génique enzyme-prodrogue (GDEPT) consiste en l’activation d’une prodrogue, administrée de façon systémique, par un enzyme dont le gène est transfecté au niveau des cellules tumorales, ciblant la toxicité de cette drogue. Une GDEPT utilisant l’activation de la cyclophosphamide par le CYP2B6 humain a déjà montré une certaine efficacité clinique. Plusieurs moyens d’amélioration existent pour cette thérapie, et la combinaison de plusieurs d’entre eux montre de bons résultats in vitro. Un domaine restant à explorer est l’amélioration de l’affinité de l’enzyme utilisé pour activer la prodrogue, dont le K_m observé pour la CPA est élevé. L’utilisation d’un enzyme canin possédant une haute affinité pour la CPA augmente l’efficacité de la thérapie chez la souris immunodéficiente mais laisse présager des réactions immunitaires chez l’humain alors que la mutagenèse dirigée sur l’enzyme humain montre une amélioration de l’affinité du CYP2B6, mais faible. Un P450 encore plus optimisé pour la 4-hydroxylation de la CPA et possédant une architecture proche de l’enzyme humaine serait potentiellement la meilleure solution pour une GDEPT performante.

En conclusion, les thérapies anticancéreuses présentent un aspect double. En effet, la destruction des cellules cancéreuses doit être suffisante afin d’éviter les récidives, tout en touchant le moins possible aux tissus sains de l’organisme. De plus, les cellules cancéreuses, très versatiles et supportant de nombreuses mutations, finissent souvent par montrer une résistance aux thérapies utilisées. Mais beaucoup de progrès ont été réalisés ces dernières années, en partie grâce au développement de la thérapie génique et des nanoparticules. Pour la chimiothérapie, dans l’ensemble, ces améliorations ont permis un meilleur ciblage de l’action des anticancéreux au niveau des cellules tumorales, réduisant ainsi les effets secondaires importants dus à la cytotoxicité des traitements. Cette cytotoxicité peut être, comme nous l'avons vu, de différents types, ce qui détermine le choix d'un traitement selon le type de cancer considéré. Ceci permet également de discriminer les effets des différents médicaments sur les cellules.

Certains projets ont ainsi été développés, qui utilisent la connaissance du mécanisme cytotoxique de certains composés dans le cadre du criblage à haut débit de molécules lors du développement de thérapies. Dans notre cas, la génotoxicité induite par le métabolite du cyclophosphamide nous intéressait dans le cadre du développement d'un crible *in vivo* de fonctionnalité des mutants de CYP2B6, optimisés pour la métabolisation de cette prodrogue.

2.8. Génotoxicité

La génotoxicité désigne une action délétère sur le matériel génétique d'une cellule, affectant son intégrité. Les substances génotoxiques sont connues comme étant potentiellement mutagènes ou carcinogènes, surtout celles capables de causer des mutations génétiques et de contribuer au développement de certaines tumeurs chez les eucaryotes supérieurs. Or cette description s'applique notamment à certains médicaments anticancéreux, impliquant la nécessité de contrôler la balance entre les effets cytotoxiques nécessaires des anticancéreux et la préservation des tissus sains.

2.8.1. Mécanismes généraux

Une première catégorie de mécanismes génotoxiques englobe ceux qui sont responsables de dommages à l'ADN, de façon directe ou indirecte. Ces atteintes à l'intégrité du génome peuvent provenir d'éléments aussi bien endogènes qu'exogènes (Muller 1927 ; Lodish, Berk et al. 1999 ; Alberts, Johnson et al. 2002).

Ces mécanismes, provoqués par des agents génotoxiques ou les processus cellulaires normaux tels que la réplication, peuvent toucher directement les bases. La production d'espèces réactives de l'oxygène, notamment, déclenchées par la cellule elle-même ou par un xénobiotique, peut provoquer la formation de bases oxydées ou la déamination de bases (Friedberg, Walker et al. 1995). Les bases peuvent également être alkylées par des agents chimiques comme la CPA (Bohr, Phillips et al. 1987). Si ces modifications ne sont pas ou mal réparées, elles peuvent engendrer des mutations et des délétions transmissibles (Lodish, Berk et al. 1999). Les analogues de bases utilisés comme anticancéreux induisent également des mésappariements engendrant des mutations ou l'arrêt de la réplication.

D'autres génotoxiques induisent des modifications de la structure de l'ADN. Les agents intercalants, les adduits chimiques ou protéiques (Lai, Ducore et al. 1987) peuvent induire des cassures double ou simple brin, qui peuvent aussi être déclenchées par divers rayonnements. La formation de dimères de pyrimidines (Setlow and Carrier 1966) ou de purines, de ponts inter- ou intra-brins empêche le bon fonctionnement de l'ADN polymérase lors de la réplication et peut induire des mutations ou des cassures de l'ADN. Tout ceci inhibe également la réplication, notamment en inhibant l'action des topoisomérases qui ne peuvent plus ouvrir correctement la double hélice pour la transcription et bloquant les fourches de réplication (Ljungman and Zhang 1996).

Tous ces mécanismes d'action peuvent être simultanés, certains évènements en induisant d'autres, certains agents possédant divers modes d'action directs ou indirects. C'est pour ceci que les mécanismes de réparation de l'ADN, même s'ils sont moins nombreux, font intervenir une multitude de protéines dont beaucoup présentent des fonctions redondantes, afin de ne pas être pris en défaut. Mais étonnamment, les acteurs des mécanismes de réparation de l'ADN sont largement conservés de la bactérie aux mammifères (Lehmann and Taylor 2001), ce qui a permis une découverte rapide des gènes impliqués dans la réparation chez certains organismes.

2.8.2. Mécanismes de réparation et protéines impliquées

Chez l'humain, ces mécanismes de réparation, dépendants d'enzymes dédiés, ne sont applicables que dans le cas de dommages physiques à l'ADN, tels que des insertions et des délétions de bases, des cassures simple ou double brin, des adduits ou des bases modifiées chimiquement, pas dans le cas de mutations ponctuelles acquises. En effet, la cellule est seulement capable de détecter, grâce à certaines molécules "senseurs", les dommages à l'ADN altérant la configuration spatiale de l'hélice (Fuchs and Tissier 2005). Donc si une mutation ponctuelle a été insérée sur les deux brins de l'ADN, celle-ci ne peut plus être détectée et peut se transmettre aux cellules filles (Friedberg, Walker et al. 1995).

Mais si une lésion est localisée à temps, une cascade de signalisation induit un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre à la cellule de réparer les dommages causés à l'ADN (Hoeijmakers 2001). Ce signal conduit également des molécules spécifiques de la réparation de l'ADN à se lier au ou près du site concerné, induisant via d'autres voies de signalisation la liaison de nouvelles molécules et la formation d'un complexe qui permet au mécanisme de réparation proprement dit d'avoir lieu (Ljungman and Lane 2004 ; Pourquier 2006).

Une cellule, dont l'ADN a subi trop de lésions ou qui n'est plus en mesure de les réparer, peut entrer en 3 états: en état de sénescence/de dormance, en état d'apoptose ou en état de division cellulaire anormale pouvant mener à la formation d'une tumeur cancéreuse (Friedberg, Walker et al. 1995).

Les différentes étapes et mécanismes de réparation peuvent s'effectuer de diverses manières :

- **Réversion directe** : ces mécanismes de réparation, les plus simples, sont utilisés pour 2 ou 3 types de dommages qu'ils peuvent chimiquement éliminer, selon les organismes. Ces mécanismes ne requièrent pas de matrice de référence, car les dommages qu'elles corrigent ne concernent à chaque fois qu'une base unique modifiée de façon précise et n'implique pas de cassure du squelette phosphodiester (Sedgwick, Bates et al. 2007; Beukers, Eker et al. 2008).
- **Dommage sur un brin** : lorsqu'un seul des deux brins de la double hélice présente un défaut, le brin complémentaire peut être utilisé en tant que matrice afin de guider la correction du brin endommagé. Afin de réparer le dommage d'une des deux molécules d'ADN, il existe une certain nombre de mécanismes de réparation par excision qui retire la base endommagée

puis qui la remplace par un nucléotide complémentaire à celui trouvé sur le brin non endommagé (Fuchs and Tissier 2005). La réparation par excision de base (BER) reconnaît et répare le dommage causé à un nucléotide unique ou une cassure simple brin causée par divers mécanismes (Pourquier 2006). La réparation par excision de nucléotide (NER) répare les dommages affectant des brins d'ADN de 2 à 30 bases. Il existe deux formes de NER : la première, connue sous le nom de Réparation Couplée à la Transcription (TCR), est induite par la présence de lésions au niveau des régions activement transcrites et la deuxième, la réparation génomique globale (GGR), est issue de la surveillance de l'ADN hors des régions transcrites ou répliquées (Ljungman and Lane 2004 ; Pourquier 2006). Quant à la réparation des mésappariements (MMR), elle est activée par la présence de bases mal appariées provenant le plus souvent d'erreurs d'incorporation par les ADN polymérases réplicatives à raison d'une base erronée toutes les 10^5 bases incorporées (Kolodner and Marsischky 1999).

- **Cassures double brin** : les cassures double brin sont particulièrement menaçantes pour la cellule car elles peuvent conduire à un réarrangement du génome. Le système de réparation mis en jeu lorsqu'il y a formation de cassures double brin d'ADN est le mécanisme de réparation par recombinaison. Il existe deux grandes voies de recombinaison de l'ADN : la recombinaison homologue (HRR), qui est un mécanisme assez lent du fait qu'il utilise le chromosome homologue non endommagé pour assurer une réparation fidèle de la lésion, et la recombinaison non homologue ou réparation par jonction d'extrémités (end-joining) (NHEJ), qui ligue les extrémités double brin générées par la cassure (Lieber, Ma et al. 2003), ce qui est beaucoup plus rapide mais le manque de fidélité peut conduire à l'insertion ou à la délétion de quelques nucléotides au moment de la jonction (Natarajan and Palitti 2008).
- **Synthèse translésionnelle** : la synthèse translésionnelle n'est pas réellement un mécanisme de réparation proprement dit puisqu'elle ne corrige pas les lésions créées mais permet à la cellule de tolérer ces lésions et ainsi de poursuivre des processus cellulaires normaux, évitant ainsi une entrée en apoptose. La synthèse translésionnelle implique l'échange d'ADN polymérases classiques pour des polymérases spécifiques à ce processus, qui possède souvent des sites actifs plus larges facilitant l'insertion de bases en face de nucléotides endommagés (Tippin, Pham et al. 2004).

2.8.3. Réponse globale aux dommages à l'ADN

Les cellules exposées aux radiations ionisantes, aux ultraviolets ou à certains produits chimiques sont enclines à l'acquisition de multiples lésions à l'ADN et de cassures double brin. De plus, les agents induisant des dommages à l'ADN peuvent atteindre d'autres macromolécules telles que les protéines, les sucres, les lipides et l'ARN. L'accumulation de dommages, surtout les cassures double brin ou les adduits bloquant les fourches de réplication, est connu comme étant un signal stimulant une réponse globale aux dommages à l'ADN (Friedberg, Walker et al. 1995). La réponse globale aux dommages est d'abord un processus d'auto préservation de la cellule et induit de nombreuses voies de réparation de macromolécules, de tolérance des lésions ou d'apoptose. Les caractéristiques communes d'une

réponse globale sont l'induction de multiples gènes, l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la division cellulaire.

Les cellules eucaryotes exposées à des agents génotoxiques activent également d'importantes voies de défense en induisant la transcription puis la traduction de multiples protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire, le trafic des protéines et la dégradation. Une telle réponse à l'échelle de tout le génome est très complexe et fortement régulée, permettant ainsi une réponse globale coordonnée aux dommages. L'exposition de la levure *S.cerevisiae* à des agents génotoxiques résulte en des profils transcriptionnels redondants mais distincts. Les similarités avec la réponse aux chocs environnementaux indiquent qu'une réponse globale au stress existe au niveau de l'activation transcriptionnelle. Au contraire, les différents types de cellules humaines répondent différemment aux dommages, indiquant une absence de réponse globale commune. L'explication probable de cette différence réside peut être dans l'hétérogénéité des cellules de mammifères, possédant différentes sensibilités aux dommages à l'ADN, contrairement aux levures où toutes les cellules réagissent de façon identique (Friedberg, Walker et al. 1995).

2.8.4. Tests de génotoxicité

Les tests existants aujourd'hui pour évaluer la génotoxicité d'un produit sont nombreux, certains étant spécifiques d'un mécanisme de cytotoxicité, alors que d'autres détectent les dommages de façon plus globale. Une majorité de ces tests a été développé afin de déterminer l'éventuelle cytotoxicité de produits destinés à la vente, comme les médicaments ou les cosmétiques. Il existe en effet une batterie de tests *in vitro* réglementaires à effectuer (ICH 1997; Thybaud, Aardema et al. 2007), qui a été élargie progressivement ces 40 dernières années, afin de couvrir le maximum de mécanismes génotoxiques possibles. Le premier et principal test utilisé est le test d'Ames (Mortelmans and Zeiger 2000), utilisant des bactéries, *S. Typhimurium*. Or, nombre d'enzymes métaboliques nécessaires à l'activation de protoxiques sont absents de *S. Typhimurium*, nécessitant ainsi, pour une interprétation correcte des résultats, l'utilisation d'une préparation de microsomes de rats traités par de nombreux produits chimiques. Un nombre importants d'autres tests a ainsi été développé et aujourd'hui, selon les lignes de conduite de l'ICH, il est nécessaire d'effectuer trois types de tests sur cellules eucaryotes avant toute mise sur le marché d'un produit pharmaceutique (ICH 1997 ; Jacobson-Kram and Contrera 2007), sauf dans le cas d'antinéoplasiques dont la génotoxicité est souhaitée.

D'autres tests plus simples et plus spécifiques ont ainsi été créés pour des cellules eucaryotes, ayant pour caractéristique commune d'utiliser la technique du gène rapporteur (Knight 2004). Nous souhaitions nous inspirer de ces tests afin de pouvoir mettre au point un système de crible à haut débit pour l'activité 4-OH-CPA hydroxylase de CYPs mutants, le métabolite de la prodrogue CPA étant un agent alkylant dont la génotoxicité a été avérée (Bubley, Ogata et al. 1994).

2.8.5. Utilisation d'un gène rapporteur dans la levure

Un gène rapporteur peut être transformé/transfecté dans une cellule en tant qu'insert dans un plasmide ou intégré au génome de l'hôte. Sa phase ouverte de lecture est placée en aval de la séquence promotrice d'un gène de l'hôte, influencée par les conditions de test appliquées (stimulée ou réprimée). Dans la majorité des cas, le produit du gène rapporteur permet d'identifier facilement les cellules dans lequel ce gène est exprimé. Les exemples les plus répandus de gènes rapporteurs sont des fluorophores, des enzymes convertissant un produit en colorant ou encore des gènes de résistance à des antibiotiques. En ce qui concerne la détection de la génotoxicité, le principe du gène rapporteur a été notamment développé dans un système eucaryote nous intéressant : la levure.

En effet, cet organisme présente à la fois la capacité d'être facilement manipulé et génétiquement modifié, en tant qu'unicellulaire, mais c'est également un eucaryote, présentant une réponse aux génotoxiques plus proche de l'humain que celle des bactéries (Ichikawa and Eki 2006).

De plus, certains enzymes du métabolisme, tels que les P450s, peuvent être exprimés en plus grande quantité dans la levure que dans la bactérie, permettant de détecter la génotoxicité de certains produits protoxiques (Cahill, Knight et al. 2004). Actuellement, plusieurs modèles de tests ont exploité les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN chez *S.cerevisiae*.

Mais le test nous intéressant le plus est celui qui est aujourd'hui commercialisé sous le nom de GreenScreen GC et consistant en un plasmide réplicatif contenant le gène rapporteur d'une GFP, modifié afin d'être exprimé de façon optimale dans la levure, et précédé du promoteur du gène RAD54 (Walmsley, Billinton et al. 1997). RAD54 a en effet un rôle central dans le processus de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HRR) (Heyer, Li et al. 2006). C'est également le test ayant été évalué sur le plus grand nombre de composés modèles de toxicité (Walmsley, Keenan et al. 2000 ; Cahill, Knight et al. 2004 ; Van Gompel, Woestenborghs et al. 2005 ; Knight, Billinton et al. 2007). De plus, il a été prouvé que ce test détectait exclusivement les agents génotoxiques (mutagènes ou clastogènes) et non les agents déclenchant du stress oxydatif ou réducteur ou encore un choc osmotique (Cahill, Knight et al. 2004). Le test de génotoxicité repose sur le calcul de divers paramètres permettant d'évaluer si un composé induit la fluorescence de la souche au-delà d'un certain seuil (Cahill, Knight et al. 2004). Le fait que le plasmide rapporteur utilisé soit réplicatif empêche en effet de pouvoir déduire un effet quantitatif d'un produit sur les cellules de levure, car chaque cellule peut contenir un nombre différent de copies du plasmide.

De façon générale, lorsqu'une cellule eucaryote est soumise à un agent génotoxique, celui-ci peut induire une multitude de dommages à l'ADN de divers types, lésant plus ou moins l'intégrité cellulaire. La réponse globale à cette agression implique l'expression d'une pléthore de gènes (Wood, Mitchell et al. 2001) (http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html) responsables de réparation post transcriptionnelles, de recombinaisons homologues, de réparation par excision de nucléotides, de points de contrôle du cycle cellulaire (Sancar 2003), d'activation globale de la transcription, de gènes contrôlant la détérioration de l'ADN et encore d'autres. L'énorme quantité de dommages infligés à une cellule l'oblige à faire un choix entre subir l'apoptose et mourir, ou survivre avec un génome modifié. En effet, un accroissement de la tolérance aux dommages peut conduire à un taux de survie augmenté mais permet une plus grande accumulation de mutations. Quant aux tests de détection de la génotoxicité, à côté des tests règlementaires classiques sur animaux ou cellules de mammifères, il existe aujourd'hui beaucoup de tests à haut débit dans les microorganismes, utilisant la technique du gène rapporteur.

3. Présentation du travail de thèse

La génération et l'analyse biochimique de banques combinatoires ou semi-rationnelles d'enzymes mutants sont de plus en plus utilisées dans le cadre de l'exploration des relations structure-fonction au sein de superfamilles d'enzymes. En effet, les méthodes classiques purement combinatoires ne nécessitent pas une connaissance *a priori* de la zone de séquence à modifier, mais engendrent des informations souvent difficiles à interpréter et nécessitent un criblage à très haut débit. Les méthodes semi-rationnelles, quant à elles, permettent d'obtenir un compromis entre l'exploration des solutions non prédictibles par des méthodes rationnelles et le nombre de clones à cribler pour obtenir des informations. Les cytochromes P450, par la complexité des relations liant leur structure primaire et leur fonction, par le manque de règles claires régissant ces fonctions et par leur versatilité, semblent être de très bons candidats pour ces deux types d'approches. La combinaison de ces deux stratégies pourrait notamment permettre d'approcher de façon globale les réponses à plusieurs questions : comment les P450s sont-ils capables de reconnaître une si grande variété de substrats ? Les structures des P450s sont-elles suffisamment conservées pour que l'on obtienne des taux de protéines actives élevées lors de la réalisation d'une banque combinatoire ? Pourquoi des P450s d'une même famille ne métabolisent-ils pas le même substrat alors que des P450s appartenant à des familles différentes le métabolisent-ils ? De même, pourquoi des isoformes très proches en termes de séquences peuvent présenter des caractéristiques biochimiques très différentes ?

De plus, l'étude de cette dernière question se trouvait au centre d'une application clinique concernant une nouvelle thérapie anticancéreuse. En effet, une thérapie génique enzyme-prodrogue utilisant un gène de P450 humain, le CYP2B6, activant la prodrogue cyclophosphamide, pourrait être améliorée par l'augmentation de l'affinité de cet enzyme pour la prodrogue. D'un autre côté, un enzyme canin de la même sous-famille, le CYP2B11, présente une forte affinité pour la cyclophosphamide mais présente le risque de déclencher une réaction immunitaire s'il est introduit dans l'organisme. L'identification des régions intervenant dans la forte affinité du CYP2B11 pour la CPA pourrait donc être utile à une modification adéquate du CYP2B6, permettant de garder une architecture proche de l'enzyme humain tout en ayant une forte affinité pour la cyclophosphamide. Des approches classiques de mutagenèse dirigée du CYP2B6, ne générant pas une diversité suffisante pour être réellement informatives, ont obtenu des résultats mitigés. Ces constatations nous ont donc amené à vouloir développer deux méthodes combinatoires en parallèle pour l'ingénierie de ce CYP2B6, le travail se décomposant en 3 parties :

- Une première partie concerne le développement d'une méthode semi-rationnelle de créations de banques de chimères avec des points de jonction définis, et ce quelle que soit la similarité de séquences des gènes parentaux. Nos modèles ont été les CYP2B6 et 2B11, possédant 78% d'identité nucléotidique.
- Une deuxième partie concerne l'analyse biochimique des mutants obtenus par cette méthode semi-rationnelle et exprimés dans la levure, vis-à-vis de divers substrats, dont la cyclophosphamide. Cette étude a été couplée à une modélisation des enzymes

parentaux et des chimères, afin de pouvoir extraire des informations globales sur la reconnaissance de substrats par le CYP2B11 et le CYP2B6.

- La troisième partie présente l'essai de mise en place d'un système de criblage dans la levure et dans *C.elegans* pour une banque combinatoire de mutants du CYP2B6. Cette banque aurait pu permettre de déterminer rapidement des mutants métabolisant la cyclophosphamide avec une bonne affinité, mais peut être moins d'extraire des informations précises sur la reconnaissance du substrat par le CYP2B6.

Résultats et Discussion

4. Partie 1 : Méthode de chimérogenèse

4.1. CONTEXTE 107

4.2. REALISATION 107

4.2.1. Méthode enzymatique 107

4.2.2. Méthode de "génération indépendante de la séquence d'une banque semi-ordonnée de chimères" ou SIGNAL (Sequence Independant Generation of a chimerA ordered Library) 108

4.2.3. Clonage des séquences chimériques 108

4.3. RESULTATS 109

4.3.1. Modélisation des CYPs 2B11 et 2B6 109

4.3.2. Dessin des modules structuraux du gène synthétique du CYP2B11 111

4.3.3. Génération des chimères 116

ARTICLE 121

4.4. DISCUSSION ET CONCLUSION 123

4.4.1. Comparaison des méthodes de construction de chimères 123

4.4.2. Méthode SIGNAL : applications 124

4.1. Contexte

Ainsi que nous l'avons vu, l'élucidation et surtout la prédiction des relations structure-fonction au sein de certaines protéines peuvent être très utiles, notamment dans le domaine de l'ingénierie protéique (Bloom, Meyer et al. 2005). Le développement de nouvelles approches *in silico* dans ce domaine est particulièrement prometteur (Wong, Roccatano et al. 2006 ; Kurtovic, Runarsdottir et al. 2007; Landwehr, Carbone et al. 2007 ; Urban, Truan et al. 2008). Quant aux deux types d'approches classiques, rationnelles ou par évolution dirigée, utilisées pour le dessin de protéines possédant de nouvelles propriétés, elles présentent chacune divers avantages et inconvénients.

De nouvelles approches semi-rationnelles ont donc été proposées afin d'adapter cette stratégie d'évolution dirigée à des cribles possédant un débit moyen. Dans ce cas, des banques combinatoires ordonnées de chimères sont étudiées et ces informations sont utilisées afin de construire des bases de données structure-fonction prédictives grâce à diverses méthodes statistiques. Il est nécessaire, pour obtenir un calcul statistique efficace, que les chimères possèdent des points de jonction définis. Une exigence similaire est retrouvée dans le cadre de l'application de l'algorithme SCHEMA (Hiraga and Arnold 2003; Meyer, Silberg et al. 2003), utilisé afin de réduire la proportion de protéines chimériques mal repliées fréquemment retrouvées dans une banque générée par recombinaison. Ces points de recombinaison déterminés par SCHEMA définissent en fait des "modules structuraux", qui peuvent être échangés entre les parents de façon combinatoire.

Dans le cadre de notre étude, nous souhaitions mettre en place une manière simple de créer cette banque ordonnée combinatoire de chimères entre deux enzymes modèles, le CYP2B6 et le CYP2B11, dans le cadre de la génération d'un enzyme optimisé pour la métabolisation de la CPA, qui serait inclus dans une GDEPT anticancéreuse en couple avec cette prodrogue.

4.2. Réalisation

4.2.1. Méthode enzymatique

Basé sur le postulat que les deux P450s 2B6 et 2B11 possédaient une identité de séquence relativement élevée (78%), nous avions donc décidé de mettre d'abord en œuvre une technique de création de chimères combinant l'utilisation d'enzymes de restriction permettant d'isoler les différents blocs structuraux et une technique de PCR fusion. En effet, ces deux approches avaient déjà été utilisées, de manière indépendante, pour la construction de chimères de protéines possédant de fortes identités (Johnston, Huang et al. 2007 ; Rosic, Huang et al. 2007 ; Cartwright, Lim et al. 2008).

Pour ce faire, les structures tridimensionnelles des CYP2B6 et 2B11 ont tout d'abord été modélisées avec le logiciel Modeller (www.salilab.com/modeller) par homologie en utilisant une structure cristalline résolue du CYP2B4 (référence PDB 1suo) (Scott, White et al. 2004).

Ces modèles tridimensionnels ont été utilisés afin de définir de façon optimale les séquences des P450s en plusieurs modules structuraux.

Un gène synthétique de CYP2B11 comprenant dans sa séquence des sites de restriction enzymatiques artificiels situés aux bornes des blocs structuraux a ensuite été dessiné afin de tester la technique mise au point. Ce gène a également été modifié afin de permettre une meilleure expression hétérologue dans les différents systèmes utilisés. Le matériel et les détails de la méthode utilisée sont décrits dans l'Annexe I 1.1, 8.2 et 8.2.1. Les difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre de cette technique nous ont amené à mettre au point une autre méthode de recombinaison des deux enzymes parentaux, présentée dans l'article joint.

4.2.2. Méthode de "génération indépendante de la séquence d'une banque semi-ordonnée de chimères" ou SIGNAL (Sequence Independant Generation of a chimerA ordered Library)

Cette deuxième technique, décrite dans l'article joint, permet, en plus de créer des points de jonction définis, de recombiner facilement des séquences possédant des structures évolutionnairement distantes. Ceci est en effet très utile pour mélanger des informations provenant des P450s, possédant souvent de faibles identités de séquence malgré leurs spécificités de substrat voisine. Quelques méthodes de chimérogenèse indépendantes de la séquence ont été décrites, mais soit elles ne permettent pas d'avoir des points de recombinaison fixes (Ostermeier, Shim et al. 1999 ; Lutz, Ostermeier et al. 2001), soit elles requièrent de nombreuses étapes (Sieber, Martinez et al. 2001). Et même s'il serait possible aujourd'hui de générer des banques à partir de gènes entièrement synthétiques, ceci resterait coûteux.

La méthode SIGNAL développée implique le fractionnement des deux protéines parentales en plusieurs modules laissés au choix de l'expérimentateur, qui seront d'abord échangés un par un puis de façon combinatoire ordonnée. Pour faciliter la description de cette méthode, une des protéines parentales sera nommée "donneuse" de modules et l'autre "accepteuse" de modules. En fonction du dessin rationnel de la banque, chaque bloc structural de la protéine accepteuse peut être remplacé par son équivalent au niveau de la protéine donneuse, et ceci indépendamment de la séquence. Les rôles de donneurs et d'accepteurs ne sont bien sûr pas fixés. De plus, les chimères synthétisées peuvent ensuite être clonées de plusieurs manières.

4.2.3. Clonage des séquences chimériques

Tout d'abord, une technique de clonage indépendant de la ligation (LIC), basée sur l'exonucléase, a été réalisée dans *E.coli* (Li and Evans 1997) (détails dans Annexe I 8.2.3).
Les difficultés résultant de l'utilisation de cette première méthode nous ont amené à utiliser le clonage *in vivo* par réparation de brèche ou "gap repair" (Ma, Kunes et al. 1987), décrit dans l'article. Cette méthode utilise la recombinaison homologue dans la levure (Orr-Weaver and Szostak 1983) comme outil de clonage (Mezard, Pompon et al. 1992) (Annexe I 8.2.4).

4.3. Résultats

4.3.1. Modélisation des CYPs 2B11 et 2B6

Les P450 2B6 et 2B11 possédant respectivement 77 et 78% d'identité de séquence protéique avec le CYP2B4, les dix modèles calculés par Modeller sont jugés corrects, même s'ils n'ont pas été validés par un deuxième programme d'évaluation. Le modèle possédant la valeur de fonction objective (calculée par Modeller) la plus basse est choisi pour l'étude de chaque P450 car il est admis qu'ils présentent la conformation énergétique la plus favorable (Eswar, Eramian et al. 2008). De plus, un modèle de CYP2B6 à fonction objective faible généré par Modeller à partir de la même structure du CYP2B4 s'est déjà révélé de haute qualité structurale après vérification par divers programmes d'évaluation (Nguyen 2007). L'observation de ces modèles nous a permis de déduire les caractéristiques supposées de la structure secondaire des P450s 2B11 et 2B6, représentées sur la Figure 41. Les 27 premiers résidus de chaque protéine, représentant l'ancre membranaire caractéristique des P450s microsomaux, n'ont pas été inclus dans la génération du modèle car ils sont absents de la structure cristalline du CYP2B4.

Les modèles présentent la structure typique des P450, en forme de prisme. Le fait d'avoir utilisé comme matrice la structure du CYP2B4 cocristallisé avec un substrat (Scott, White et al. 2004), appelée structure "fermée", a engendré des modèles structuraux d'apparence plutôt "fermés", en opposition avec la structure du CYP2B4 cristallisé seul (Scott, He et al. 2003), où la protéine présentait un aspect très "ouvert" (Scott, He et al. 2003). Mais le taux d'identité de séquence et l'extrême proximité structurale observée entre le CYP2B4 et les CYPs 2B11 et 2B6 (Figure 41) semblent indiquer que ces deux P450s présentent également une forte flexibilité, permettant une adaptation optimale de l'enzyme par rapport à son substrat.

La structure typique du site actif du CYP2B6, qui avait d'abord été modélisée à partir de la structure du CYP2C5 (Bathelt, Schmid et al. 2002), puis à partir de la structure du CYP2B4 (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008), a également été retrouvée au niveau de nos modèles. Le site est constitué de 3 poches hydrophobes composées des résidus Phe206, Ala298, Thr302, Leu363 pour la poche nommée A ou poche de l'hème; de Ile114, Phe115, Ser294, et Phe 297 pour la poche B, et Ile209, Val367, et Val477 pour la poche C. Le résidu Leu216, qui avait été désigné comme appartenant à la poche C par Bathelt (Bathelt, Schmid et al. 2002), n'est dans notre modèle pas orienté vers le site actif comme c'est le cas pour la structure générée par Nguyen (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) à partir du CYP2B4 complexé avec ligand. Dans le cadre de cet article, une expérience d'amarrage et de dynamique de la CPA au niveau du site actif modélisé du CYP2B6 a également été réalisée. La position de la CPA déterminée lors de ces expériences correspond aux hypothèses émises dans l'article précédent, à savoir que la position la plus favorable à la métabolisation de la CPA est celle où le cycle se trouve au niveau de la poche A alors que les deux terminaisons bischloroethyl se trouvent chacune au niveau d'une des boucles B ou C.

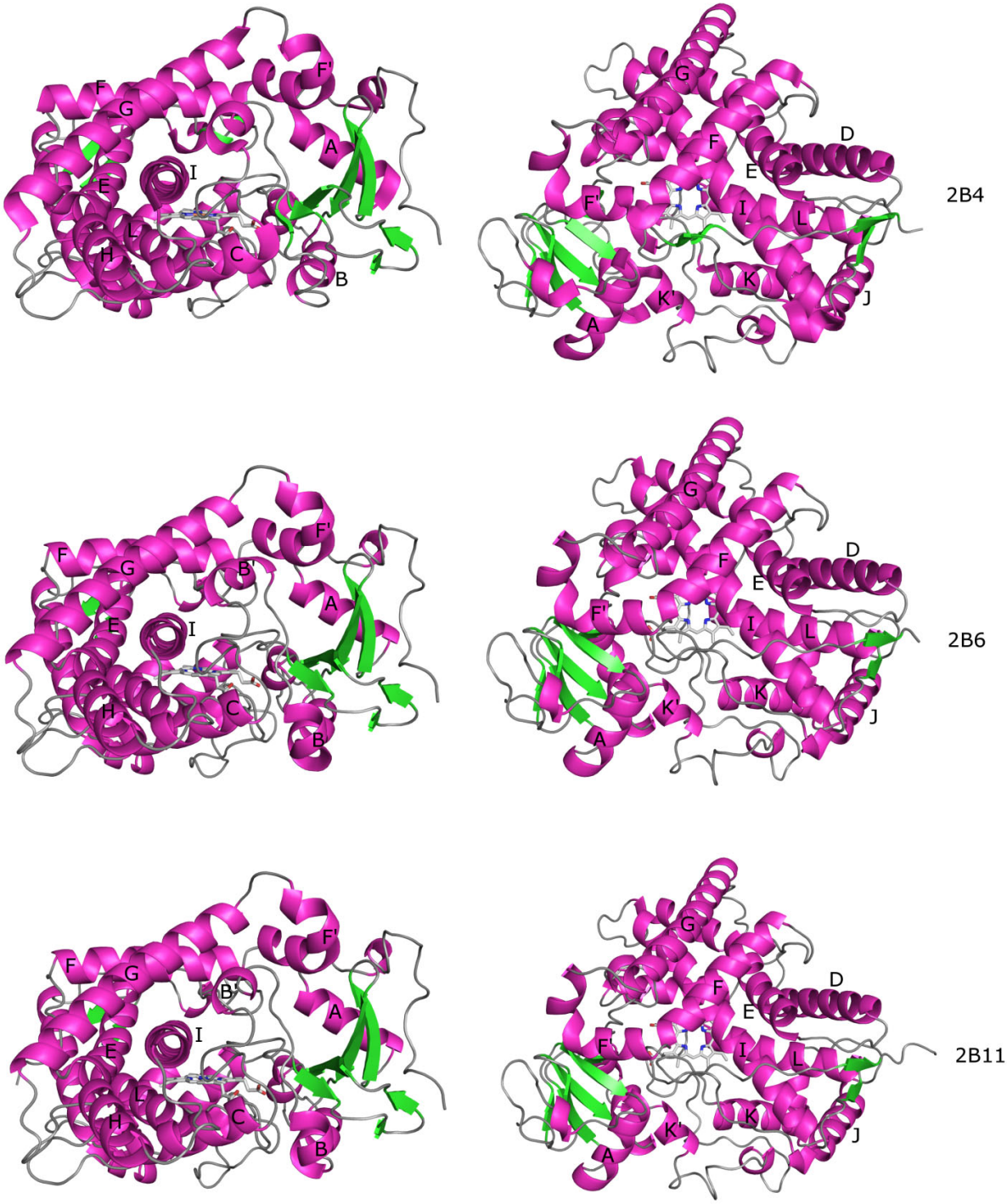


Figure 41. Vue de côté en amont de l'hélice I (à gauche) et vue d'en haut par la face distale (à droite) des structures tridimensionnelles des CYPs 2B4 (en haut), 2B6 (au milieu) et 2B11 (en bas). Les hélices sont représentées en rose, les feuillets en vert, les boucles en gris. Les hélices principales sont annotées selon la nomenclature de Poulos (Poulos, Finzel et al. 1985).

En considérant les acides aminés constituant les poches hydrophobes du site actif, seul un acide aminé diffère entre le CYP2B11 et le CYP2B6. La topologie de chacun des sites que nous avons modélisés est représentée en Figure 42.

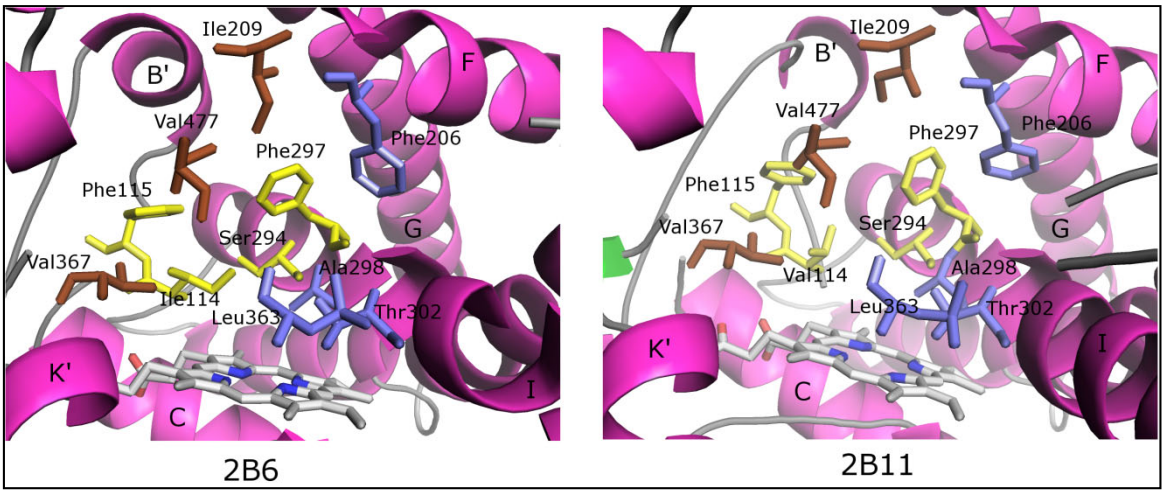


Figure 42. Acides aminés impliqués dans la constitution des poches hydrophobes du site actif pour le CYP2B6 et le CYP2B11. Les acides aminés composant les poches A, B et C sont indiqués respectivement sous forme de bâtonnets bleus, jaunes et marron. L'hème est représenté sous forme de bâtonnets blancs.

Les 3 poches sont effectivement visibles pour chacun des P450s, confirmant les précédentes modélisations pour le CYP2B6 et permettant d'étendre ce modèle au site du CYP2B11. Même s'il n'existe pas de différences structurales majeures évidentes entre les 2 modèles de sites, la mutation de l'isoleucine 114 du CYP2B6 en valine du CYP2B11 améliore l'affinité d'un facteur 2, ce qui serait du au fait que l'encombrement stérique un peu plus faible de la valine par rapport à l'isoleucine permettrait un meilleur placement de la CPA dans le site actif (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).

4.3.2. Dessin des modules structuraux du gène synthétique du CYP2B11

4.3.2.1. Découpage de la séquence du CYP2B11

Ce gène synthétique de CYP2B11 (GenBank n°EU736326) a été dessiné afin d'introduire des mutations silencieuses pour créer des sites de restriction enzymatiques uniques pouvant délimiter des modules structuraux qui seraient ensuite échangés entre le CYP2B6 et le CYP2B11, permettant de créer des chimères avec des points de jonction définis. De plus, certains codons ont été modifiés afin que le gène puisse être exprimé efficacement aussi bien dans la levure que dans des cellules humaines (Figure 43). Au vu de la taille des séquences protéiques des P450s ainsi que de la taille désirée de la banque il a été décidé de diviser la séquence protéique du CYP2B11 en 15 modules structuraux, ce qui fait une moyenne d'environ 7 acides aminés différents entre le CYP2B11 et le CYP2B6, par module et un nombre d'activités enzymatiques à tester relativement raisonnable.

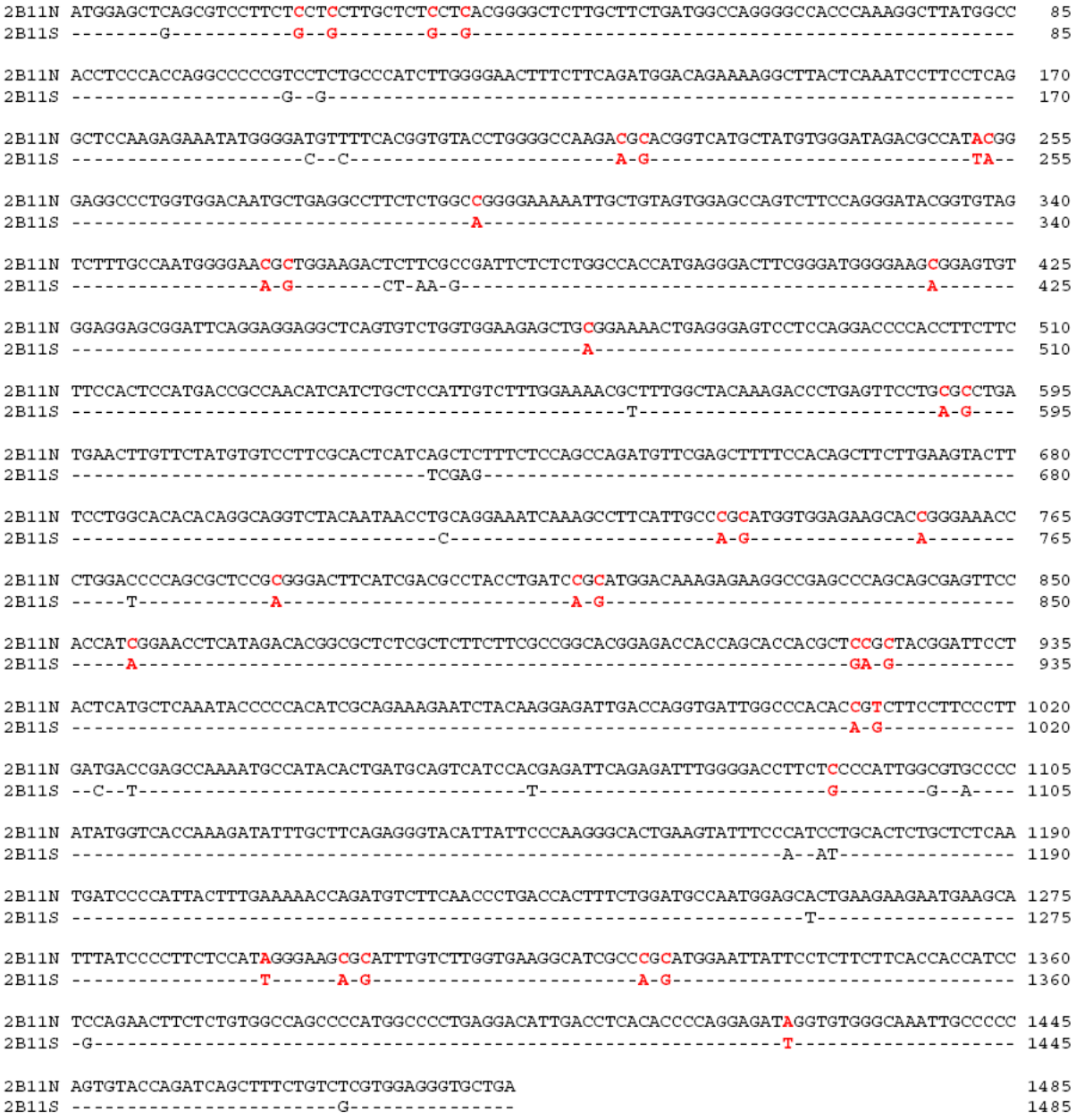


Figure 43. Alignement de séquences nucléotidiques des phases ouvertes de lectures natives (2B11N) et synthétique (2B11S) codant pour le CYP2B11. Les modifications en noir correspondant aux bases mutées afin de générer des sites enzymatiques uniques aux bornes des modules structuraux, celles en rouge aux modifications effectuées afin de se rapprocher du biais de codon observé chez *S.cerevisiae*. Certains codons, rares dans la levure, tel que CTC pour la leucine, ont été remplacés par des codons utilisés plus couramment dans cet organisme et dans les cellules humaines, tel que CTG, afin d'obtenir une bonne expression hétérologue.

Ensuite, les limites des fragments, constituées des sites enzymatiques choisis, ont été positionnées au niveau de séquences protéiques identiques entre le CYP2B11 et le CYP2B6. En effet, après digestion de la séquence nucléotidique du CYP2B11 par deux enzymes différents, les deux fragments résultant de cette digestion sont hybridés avec la séquence nucléotidique du CYP2B6 afin de servir d'oligonucléotides de grande taille (ou méga-oligos) dans le cadre d'une expérience d'élongation par une ADN polymérase. Il est donc nécessaire que l'hybridation avec la séquence du CYP2B6, au niveau des extrémités digérées, soit la meilleure possible. Et même si la séquence nucléotidique codante n'est pas forcément identique pour les CYPs 2B11 et 2B6, l'hybridation devrait être suffisante pour permettre une activité correcte de l'ADN polymérase lors de l'étape d'élongation de la technique.

De plus, dès que ceci était possible, les bordures des modules ont été placées en dehors des éléments de structure secondaire, afin d'éviter un éventuel défaut de repliement qui aurait pu découler de la perturbation des interactions entre résidus issue de l'échange de résidus entre les deux parents. Enfin, les limites des blocs ont également été déterminées en fonction de contraintes liées à la séquence nucléotidique du CYP2B11, la phase ouverte de lecture (ORF) synthétique ne devant présenter que des mutations silencieuses et les sites enzymatiques choisis devant être présents de façon unique dans la séquence du CYP2B11. Certaines bases ont ainsi été modifiées afin de supprimer certains sites enzymatiques excédentaires.

Deux fragments de séquences régulatrices de 100 paires de bases, bordés chacun par deux sites de restriction, ont été insérés à chaque extrémité de l'ORF synthétique (GenBank n°EU736326): à la fois en vue d'un clonage de ce gène par "gap repair" dans un vecteur d'expression de levure, pYeDP1-8-2, possédant des séquences homologues à ces séquences régulatrices, et pour que ces séquences communes aux extrémités de toutes les chimères puissent être utilisées pour amplifier celles-ci lors de l'étape finale de la technique.
Le positionnement des sites enzymatiques sur les séquences protéiques des P450s 2B11 et 2B6 est représenté en Annexe II Figure 92, ainsi que le nom de chaque module structural protéique désigné dans l'ordre par une lettre, de A à O.

4.3.2.2. Structure des modules

La position des modules structuraux déterminés est représentée sur la structure tridimensionnelle du CYP2B11 sur la Figure 44.
Les éléments de structure secondaire sont déterminés à partir des modèles et représentés sur la Figure 45. Les noms de ces différents éléments de structure secondaire sont déduits de la nomenclature mise en place pour les P450s (Poulos, Finzel et al. 1985).

Nous observons que la cystéine catalytique se trouve dans le fragment N et que les acides aminés constituant la poche A hydrophobe du site actif se trouvent à la fois dans le fragment F (206), le fragment J (298, 302) et le fragment K (363). Les résidus de la poche B se répartissent entre les fragments C (114, 115) et le fragment I (294, 297). Enfin, les résidus composant la poche C se distribuent entre les fragments G (209), L (367) et O (477).

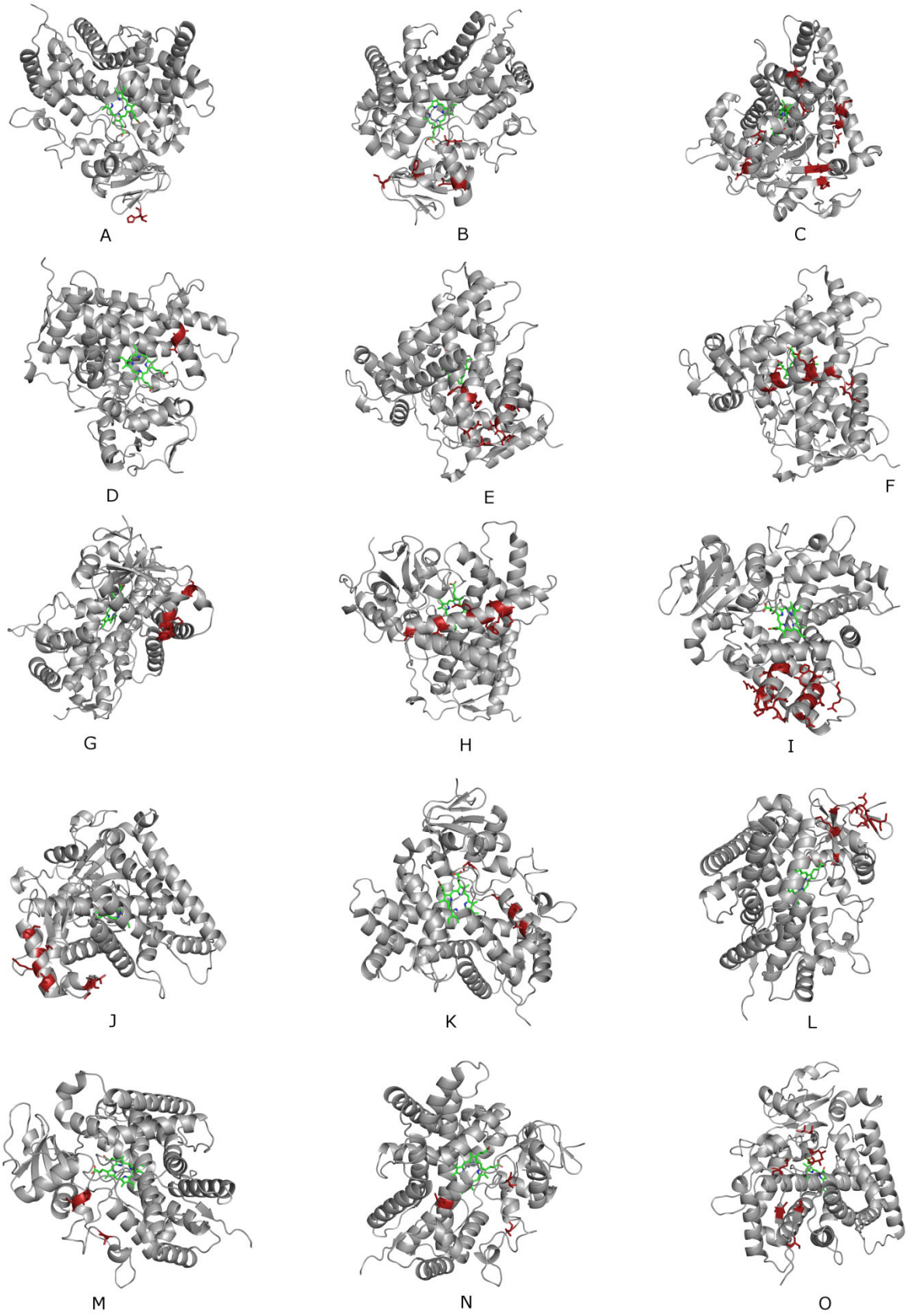


Figure 44. Représentation des acides aminés différant entre le CYP2B6 et le CYP2B11 pour chaque module structural, de A à O, sur la structure 3D du CYP2B11. La structure du CYP2B11 est représentée en gris, l'hème sous forme de bâtonnets verts et les acides aminés sous forme de bâtonnets rouges.

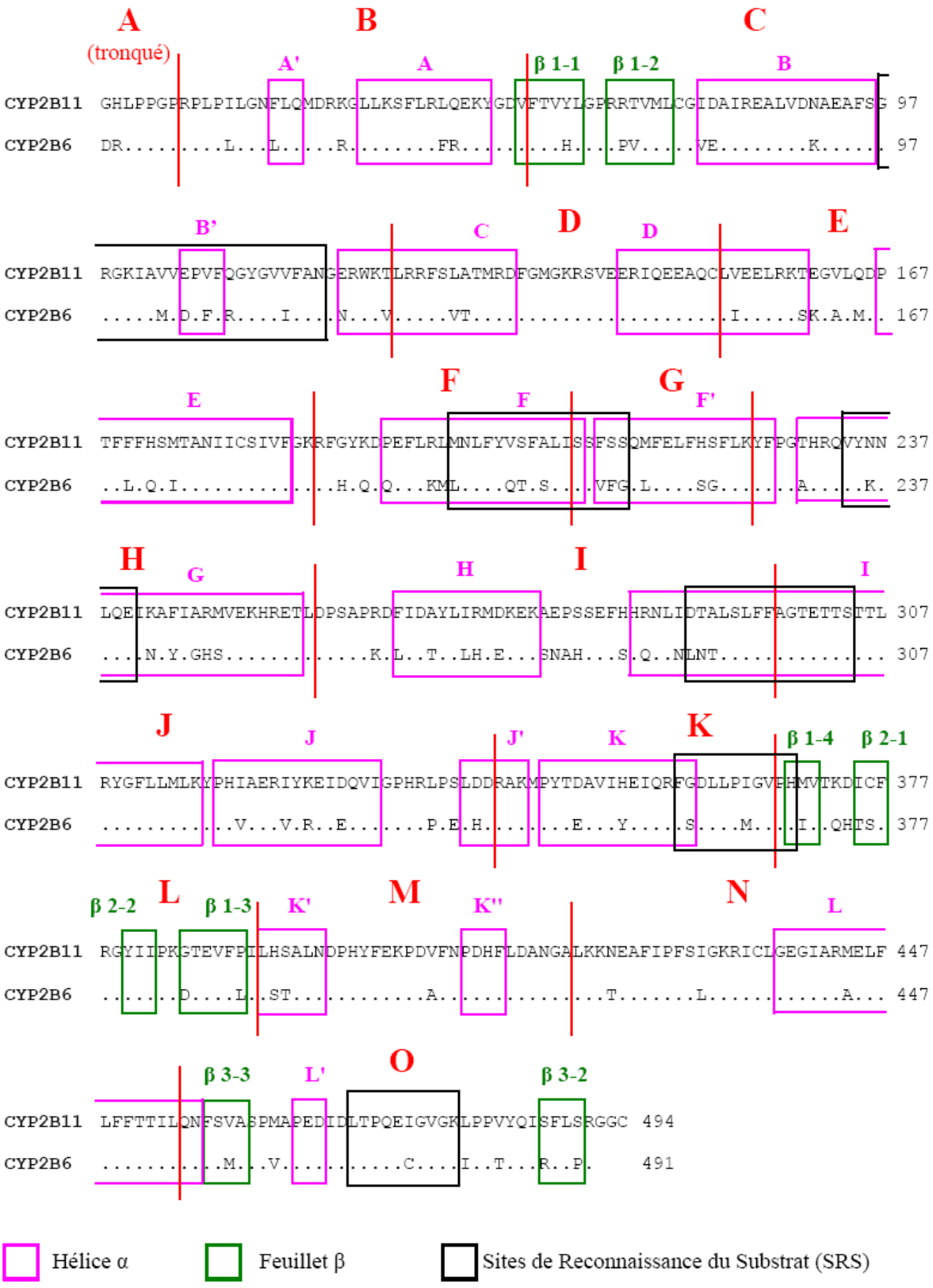


Figure 45. Alignement des séquences protéiques tronquées de leur ancre membranaire des P450s 2B6 et 2B11. Les limites des modules structuraux sont indiquées en rouge. Les noms des modules structuraux et des différents éléments de structure secondaire sont indiqués respectivement en rouge et en noir, au-dessus des encadrés

4.3.3. Génération des chimères

4.3.3.1. Méthode enzymatique

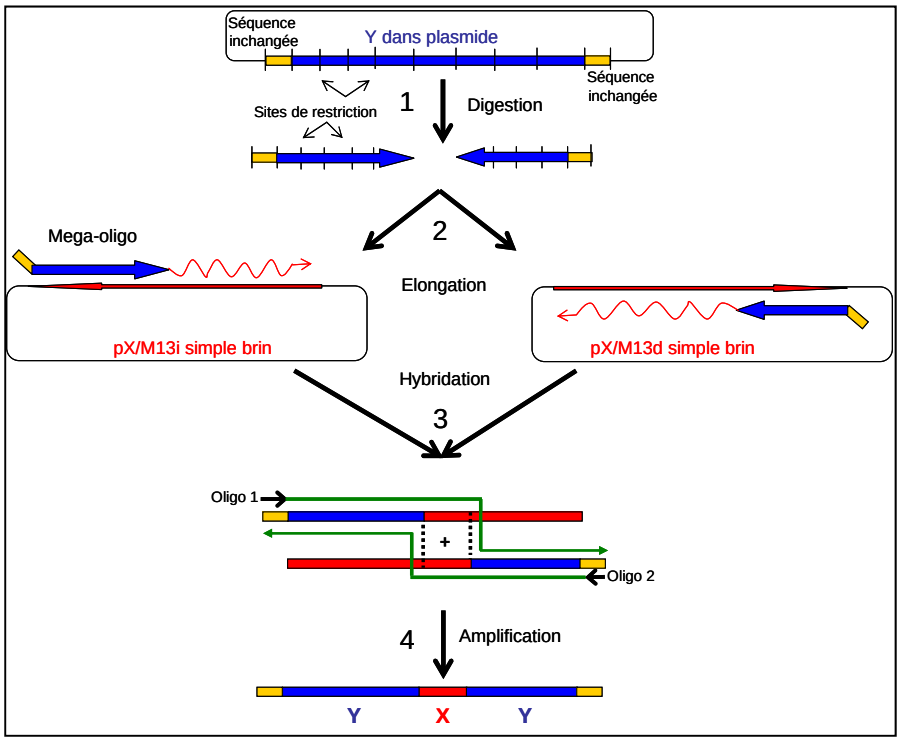


Figure 46. Méthode enzymatique de chimérogenèse. Le gène synthétique de Y et l'ORF de X sont clonés dans pPCR Script et M13mp19 comme indiqué dans l'annexe I8.2.1. Les sites de restriction insérés dans la séquence d'Y sont représentés par des barres noires. Les mégas oligos de l'étape d'élongation ont été utilisés parfois ensemble et parfois séparément.

La technique de chimérogenèse utilisée est représentée en Figure 46. La séquence X (X) est définie en tant que séquence donneuse et la séquence Y (Y) en tant que séquence acceptrice de fragments. La séquence acceptrice est découpée en modules ou blocs délimités par des sites de restriction enzymatiques. Le but de la technique est de remplacer un ou plusieurs de ces blocs Y par leurs équivalents présents dans X.

La première étape consiste en plusieurs digestions enzymatiques de Y, afin de l'extraire du plasmide dans lequel elle est incluse et de créer un ou plusieurs intervalles, correspondant à la taille et à la position du/des module(s) qui sera(ont) échangé(s) entre X et Y (Figure 46.1). Les fragments de Y issus de cette digestion sont ensuite hybridés avec X et une élongation est réalisée afin de produire deux séquences chimères bipartites X et Y (Figure 46.2). Ces deux séquences chimères sont ensuite hybridées (Figure 46.3) au niveau du (des) fragments échangé(s) et une PCR fusion (Figure 46.4) produit la chimère finale.

Après la digestion de Y (Figure 46.1), les fragments obtenus sont purifiés sur gel afin d'éviter toute contamination parentale qui pourrait se produire lors de l'étape d'amplification finale où sont utilisés deux oligos complémentaires aux séquences communes présentes à

chaque extrémité de Y. L'hybridation des fragments de Y avec la séquence X est facilitée par l'usage de deux matrices simple brin (issues du clonage dans pM13mp19) et par un cycle de dénaturation suivi d'un cycle d'hybridation long utilisant des paliers de température descendants.

Les fragments de Y servent alors de méga-oligos, un dans le sens direct et un dans le sens indirect, lors de cette étape d'élongation (Figure 46.2) permettant de générer deux chimères bipartites constituées d'un des méga-oligos de la séquence acceptrice en 5' et de la séquence donneuse en 3', la séparation se situant au niveau du point de jonction défini par la coupure enzymatique. A chaque extrémité de ces méga-oligos, et donc par là même à l'extrémité de chacune de ces chimères bipartites se situent des séquences qui sont communes à toutes les chimères car elles ne seront jamais digérées ni échangées entre X et Y.

Ces séquences sont d'ailleurs utilisées dans l'étape suivante de la technique où le mélange de ces deux chimères bipartites est incubé à une température dénaturante puis refroidi doucement à une température d'hybridation afin de permettre une bonne hybridation (Figure 46.3) des chimères au niveau des séquences communes aux extrémités et au niveau du segment à échanger.

Cette hybridation peut ensuite servir à la réalisation d'une PCR fusion (Figure 46.4) utilisant deux oligos spécifiques des séquences communes des extrémités des chimères, les oligos 1 et 2.

4.3.3.2. Application

Les détails de la réalisation de cette méthode sont décrits dans l'Annexe I 8.2.1. Cette méthode a été appliquée à la génération de chimères entre la séquence donneuse du CYP2B6 et la séquence acceptrice du CYP2B11. Les modules et les enzymes de restriction définis pour le CYP2B11 sont présentés en Figure 92. Chaque chimère construite porte le nom, de A à O, du fragment de CYP2B6 inséré dans l'architecture du CYP2B11. Les différents essais réalisés pour les chimères L-M et F ainsi que leurs issues, lors de la mise au point de cette technique, sont présentés en détail dans l'annexe II Tableau 5.

Là où tous les tests effectués lors de la réalisation de la chimère L-M ont aboutis à l'amplification finale de la chimère en totalité, les tests effectués pour la chimère F, quelles que soient les configurations utilisées et les conditions de réalisation de l'amplification finale, n'ont pas permis d'obtenir des fragments d'ADN visibles sur gel d'agarose. Ceci est probablement du à une mauvaise hybridation des méga-oligos avec la matrice simple brin, ce qui inhibe l'élongation. En effet, lors de la construction de la chimère F, un des méga-oligos génère un fragment de 5 paires de bases non hybridées avec l'ORF du CYP2B6 à l'extrémité 3' du méga-oligo. Les polymérases utilisées, très sensibles au mésappariement des matrices du côté 3', ne peuvent pas exercer leur activité correctement et il n’y a donc pas d'élongation du méga-oligo dans ce cas-là.

Par ailleurs, une des amplifications témoins, réalisée sans méga-oligos, a permis d'observer, dans une des conditions, une bande de faible intensité sur gel d'agarose, d'une

taille correspondante à celle d'une chimère complète. Ce résultat peut provenir d'une contamination du mélange d'amplification par la séquence acceptrice, CYP2B11, possédant les séquences nécessaires à l'hybridation des oligos.

L'ADN d'une des amplifications correctes de la chimère L-M est ensuite clonée dans un vecteur bactérien réplicatif, puis l'ADN extrait de 2 clones issus de cette manipulation a été envoyé à séquencer. La séquence du premier clone est en fait une contamination parentale du CYP2B11 et la séquence du deuxième correspond à celle d'une chimère bipartite issue de l'élongation. Le fait que les séquences communes sur lesquelles s'hybrident les oligos pour l'amplification finale soient présentes au niveau des extrémités de la séquence acceptrice (ici CYP2B11) et des chimères bipartites à l'issue de l'élongation est *a priori* à l'origine de cette contamination.

Les problèmes rencontrés lors de l'utilisation de cette technique nous ont poussé à mettre au point une nouvelle méthode de chimérogenèse, SIGNAL, permettant d'éliminer plus efficacement la contamination parentale et étant moins dépendante des séquences parentales afin d'éviter les mésappariements observés. La technique développée afin de pallier aux manques de la précédente est décrite en détail dans l'article joint.

4.3.3.3. Méthode SIGNAL : réalisation

Brièvement la technique SIGNAL (Sequence Independant Generation of a chimerA ordered Library), s'effectue en cinq étapes. La première étape utilise une amplification de la séquence donneuse avec un oligo bipartite comportant une partie de séquence acceptrice et une partie de séquence donneuse afin d'ajouter un fragment de séquence acceptrice en amont du point de jonction de la chimère réalisée. La deuxième étape utilise un système biotine-avidine afin d'éliminer définitivement la matrice parentale et ainsi éliminer les contaminations possibles de séquence donneuse. La troisième étape est une amplification toujours effectuée avec un oligo bipartite et permettant de flanquer le module structural donneur devant être échangé par deux fragments de séquence acceptrice. Cette construction est utilisée durant l'étape 3 afin de générer deux éléments de la chimère finale qui sont homologues au niveau du module à échanger. Ces deux parties sont assemblées lors d'une PCR fusion finale avec des oligos situés aux extrémités des séquences parentales afin de générer la chimère complète. Ces chimères ont ensuite été clonées une première fois dans la bactérie puis dans la levure.

4.3.3.4. Clonage indépendant de la ligation (LIC) de l'ADN des chimères dans pYeDP1-8-2 (pV8)

Cette technique consiste à utiliser l'exonucléase III afin d'exposer l'ADN complémentaire d'un insert et un vecteur présentant des séquences homologues (Figure 47), rendant le clonage dans *E.coli* totalement indépendant des compatibilités de restriction. Ces séquences homologues se trouvent aux extrémités de l'insert, issu d'une amplification ou extrait par digestion enzymatique, et du vecteur, linéarisé par restriction. Les enzymes utilisés pour ces diverses digestions peuvent être différents et créer aussi bien des bouts francs que des bouts

collants. L'insert et le vecteur sont ensuite digérés par l'exonucléase III qui possède une activité exonucléasique uniquement de 3' vers 5' (sauf si l'extrémité 3' est protubérante, dans ce cas l'enzyme est inactive), générant ainsi des bouts collants.

Le taux d'activité exonucléasique de l'exonucléase III est très uniforme, il est donc simple de déterminer approximativement la cinétique de digestion de l'exonucléase III. Après avoir effectué quelques calibrations, l'insert et le vecteur digérés de façon optimale sont mis en présence afin qu'ils puissent s'hybrider au niveau de leur extrémité sortante homologue. Si ces dernières sont malgré tout de taille différentes (création de brèches ou de protubérances, voir Figure 47), il a été observé qu'*E.coli* étaient capables de réparer ces anomalies et de générer un vecteur circulaire correct incluant l'insert (Li and Evans 1997).

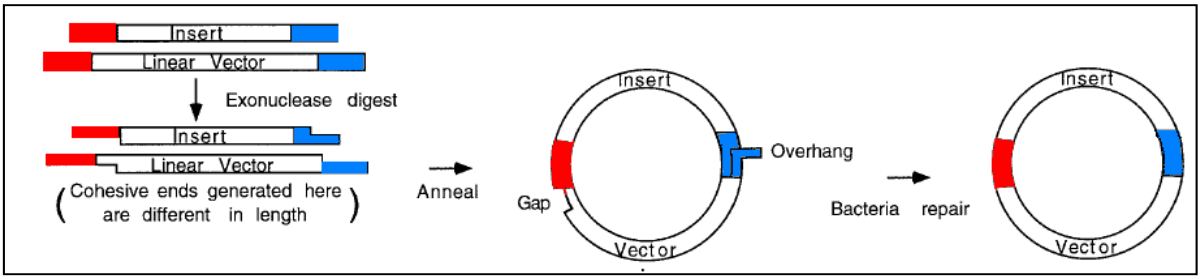


Figure 47. Représentation de la méthode de clonage indépendante de la ligation (LIC) (Li and Evans 1997).

4.3.3.5. Application

Dans le cas de notre technique de chimérogenèse, les phases ouvertes de lecture chimériques ont été flanquées de part et d'autre par un fragment de promoteur ou de terminateur communs à tous les variants. Le vecteur d'expression pV8 choisi pour le clonage possédait, quant à lui, des séquences régulatrices homologues à celle des constructions chimériques, ceci permettant d'utiliser ce couple insert/vecteur dans le cadre du clonage indépendant de la ligation. En premier lieu, la cinétique de digestion de l'exonucléase III sur nos différentes matrices a été définie avant le clonage final. Tous les détails de la réalisation de cette technique se trouvent dans la partie Annexe I 8.2.3. Les résultats détaillés de la calibration du temps de digestion par l'exonucléase III du vecteur pV8 et des inserts chimériques sont présentés en Annexe II. Après détermination des temps adéquats de digestion par l'exonucléase III, une partie du stock de pV8 digéré a été hybridé avec chacune des chimères également digérées puis transformées dans *E.coli*. Le séquençage de l'ADN issu de clones nous a permis d'observer que toutes les séquences chimériques avaient été correctement insérées dans le vecteur pV8.

Mais le séquençage de ces constructions a mis en évidence de nombreuses mutations ponctuelles au sein des séquences des chimères, incompatibles avec la création d'une banque ordonnée de chimères reposant sur des mutations non aléatoires. Ceci peut être du au phénomène de réparation ayant lieu dans la bactérie après la transformation de la construction issue de l'hybridation de l'insert et du vecteur.

Le comblement des intervalles et l'élimination de l'excédent d'ADN réalisés par la bactérie ont pu induire certaines mutations ponctuelles dans les séquences.

Malgré la meilleure transformabilité, la rapidité de croissance et la plus faible quantité de matériel nécessaire à la transformation dans la bactérie, le gap repair dans la levure décrit dans l'article, induit moins de mutations ponctuelles et a donc été choisi comme technique finale de clonage des chimères.

Article

Sequence – independant construction of ordered combinatorial libraries with predefined crossover points

Jezequel L., Loeper J. & Pompon D.

Biotechniques (2008), 45(5) : 523-32

Sequence-independent construction of ordered combinatorial libraries with predefined crossover points

Laetitia Jézéquel, Jacqueline Loeper, and Denis Pompon
Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France

BioTechniques 45:523-532 (November 2008)
doi 10.2144/000112954

Combinatorial libraries coding for mosaic enzymes with predefined crossover points constitute useful tools to address and model structure-function relationships and for functional optimization of enzymes based on multivariate statistics. The presented method, called sequence-independent generation of a chimera-ordered library (SIGNAL), allows easy shuffling of any predefined amino acid segment between two or more proteins. This method is particularly well adapted to the exchange of protein structural modules. The procedure could also be well suited to generate ordered combinatorial libraries independent of sequence similarities in a robotized manner. Sequence segments to be recombined are first extracted by PCR from a single-stranded template coding for an enzyme of interest using a biotin-avidin-based method. This technique allows the reduction of parental template contamination in the final library. Specific PCR primers allow amplification of two complementary mosaic DNA fragments, overlapping in the region to be exchanged. Fragments are finally reassembled using a fusion PCR. The process is illustrated via the construction of a set of mosaic CYP2B enzymes using this highly modular approach.

INTRODUCTION

Development of new in silico approaches for the prediction of protein structure-function relationships is of major interest for biotechnology (1–3). Classically, rational design of proteins with new properties of interest relies on X-ray or nuclear magnetic resonance (NMR)-based structures as well as modeling of substrate-protein interactions. However, structure-based predictions have limited power when multistep or complex mechanisms are involved. In contrast, in vitro approaches, like directed molecular evolution, have proven to be a powerful tool for function optimization, without prerequisite structural knowledge. But these methods are resource demanding, and these case-by-case approaches are generating very little reusable knowledge. Giving predictive value to combinatorial engineering remains a challenge. Classical directed evolution relies on the functional selection of sequence variants with a randomly recombined mutation set giving improved property. Association of useful mutations into a single sequence is generally performed by DNA shuffling, also called molecular breeding (4–8). Although this optimization process is efficient, when high-throughput selection or screening systems are available, its applicability is limited when complex functional criteria are involved. An alternate semi-rational approach was proposed to accommodate the directed evolution to low-throughput selection systems. This is based on a strategy in which functional properties of fully ordered combinatorial libraries are determined and used to build predictive structure-function databases by statistical approaches. To make statistical calculation efficient, these combinatorial libraries must feature only predetermined recombination points. Similar requirements are found to apply the SCHEMA computational algorithm (9,10) which was proposed to reduce the probability to generate misfolded chimeric proteins that are frequently generated upon DNA shuffling. SCHEMA method helps predicting recombination points between parents that can be tolerated or not, thus determining "structural modules" that can be successfully rearranged in a combinatorial manner. The described sequence-independent generation of a chimera-ordered library (SIGNAL) method offers a new efficient way to construct such libraries with predefined recombination points required both for SCHEMA algorithm-based library and for statistical approaches of structure-function relationship.

Alternate methods have been previously described to create such libraries, either based on common restriction sites (11–12) or on fusion-PCR (13), but are limited to high similarity sequences. Homology-independent approaches have been described too, but they do not allow control of crossover points and generate a high level of "out of alignment" fusion (14,15) or they require numerous steps (16). Although fully synthetic gene library also emerges as a promising approach, it remains resource demanding and highly expensive.

The developed SIGNAL method involves the partitioning of two protein sequences into sequence modules, chosen at will by the experimenter. For an easier description, one protein sequence will be defined as "donor" and the other as "acceptor." Based on the rational design chosen for the library, any acceptor sequence block can be replaced by its donor counterpart in a sequence-independent manner. Crossover points can be freely chosen, and the approach would be easy to automate using robotic tools to generate full or defined subsets of combinatorial libraries. Furthermore, the role of donor and acceptor can be easily swapped. As a proof of principle, we used SIGNAL to create a set of defined chimeras between cytochromes P450 (CYP) 2B6 and 2B11. This library was designed to optimize the kinetic parameters for the activation of a chemotherapeutic prodrug, cyclophosphamide. In our case, the proteins have fairly high overall sequence similarity (78% identity), but this parameter has no influence on the construction efficiency of the desired chimeric sequences.

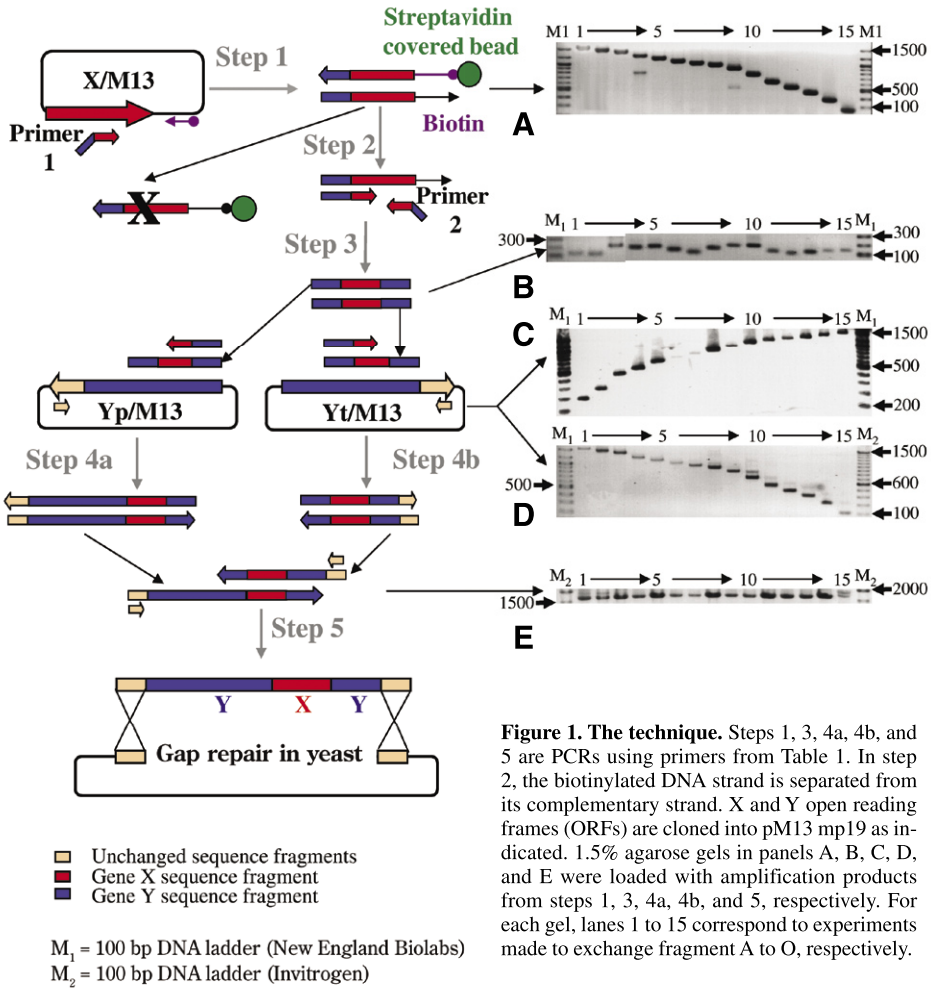


Figure 1. The technique. Steps 1, 3, 4a, 4b, and 5 are PCRs using primers from Table 1. In step 2, the biotinylated DNA strand is separated from its complementary strand. X and Y open reading frames (ORFs) are cloned into pM13 mp19 as indicated. 1.5% agarose gels in panels A, B, C, D, and E were loaded with amplification products from steps 1, 3, 4a, 4b, and 5, respectively. For each gel, lanes 1 to 15 correspond to experiments made to exchange fragment A to O, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Reagents, Strains, and Material

Milli-Q water (Millipore, Billerica, MA, USA) with a resistance of 18.2 Ω was used for all the experiments. Platinum *Taq* DNA polymerase kit (Invitrogen, Cergy, France) was used for all amplifications. Magnetic carboxylic acid Masterbeads 500 nm and their recommended buffers were purchased from Ademtech (Pessac, France). Streptavidin was from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Reverse phase-purified oligonucleotides (Eurogentec, Liège, Belgium) were resuspended in water and further purified using ion pairing reverse phase chromatography. CYP2B11 synthetic cassette was produced by GeneCust (Dudelange, Luxembourg). All enzymes were purchased from New England Biolabs (Hitchin, UK).

Saccharomyces cerevisiae strain W303–1B (*MATα*, *ade2–1*, *trp1–1*, *leu2–3,112*, *his3–11, 15*, *ura3–1*) (17) was used for cloning by gap repair. *Escherichia coli* strains were DH5αF'IQ competent cells (Invitrogen) for cloning into pM13mp19 vector and Top 10 chemically competent cells (Invitrogen) for DNA amplification for sequencing.

Construction of Template Plasmids

Single-stranded DNA of human CYP2B6 and of canine CYP2B11 templates was prepared by cloning the CYP open reading frames (ORFs) into a pM13mp19 plasmid (18). The CYP2B6 ORF was extracted from p2B6/pYeDP60 (19) by *Bam*HI digestion and ligated into *Bam*HI-digested pM13mp19, giving p2B6/M13. Clones with the CYP2B6 ORF into the pM13mp19 positive strand were selected. A synthetic CYP2B11 expression cassette was designed based on GenBank CYP2B11 cDNA coding sequence (accession no. NM_001006652) and was recoded using a yeast codon bias to optimize expression (GenBank accession no. EU736326). The CYP2B11 ORF was flanked by 100 bps of the *GAL10-CYC1* promoter (delimited by *Bss*SI and *Pac*I sites) and the *PGK* terminator (delimited by *Nhe*I and *Asc*I sites) sequences, respectively. The synthetic gene cloned into pPCR Script Amp (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) was digested either with *Bss*SI and *Nhe*I or by *Pac*I and *Asc*I, and resulting fragments were made blunt-end by treatment with DNA polymerase I Klenow fragment before ligation into *Hinc*II-digested pM13mp19 to yield p2B11p/M13 and p2B11t/M13, respectively. The constructs were selected to have either the CYP2B11 ORF in the p2B11p/M13 negative strand or the CYP2B11 ORF in the p2B11t/M13 positive strand.

Preparation of Streptavidin-Covered Magnetic Beads

Three milligrams of magnetic Masterbeads were functionalized following the manufacturer's protocol. Washing steps were performed with 300 µL manufacturer's recommended buffers, and protein immobilization was performed using 30 µg streptavidin. Following bovine serum albumin (BSA) saturation, beads were washed three times and suspended in immobilization buffer for immediate use.

Modeling

CYP2B6 and CYP2B11 protein sequences were aligned, and their three-dimensional (3-D) structures were modeled using rabbit CYP2B4 (PDB reference 1suo) as template and the Modeller program (available at www.salilab.org/modeller). 3-D models were used to optimally partition P450 sequences into 15 fragments (A to O) as described (see Figure 2).

Primer Design

All primers used in this study are listed in Table 1. Names of primers A to O match names of constructed chimera. Forward primers A1 to O1 include 12- to 15-bp oligonucleotides complementary to the CYP2B11 ORF followed by 20–24 bp complementary to CYP2B6 ORF at their 3′ end. Reverse primers A2 to O2 comprise 12–17 bp identical to CYP2B11 ORF followed by 19–22 bp identical to CYP2B6 ORF (see Figure 2 for details). Oligonucleotide 5′-biot features a 5′ Biotin-TEG structure that was purchased from Eurogentec.

Chimera Construction

Fifteen chimeras were generated by replacing each sequence fragment from A to O into the CYP2B11 ORF by the corresponding CYP2B6 sequence fragments based on indicated alignment (see Figure 2). Each variant was given a unique name (capital letters A to O indicating the swapped CYP2B6 fragment). As an example, the following protocol was carried out to create chimera A and was found effective for the construction of all chimeric structures. PCR amplifications were performed using Platinum *Taq* DNA polymerase according to the manufacturer's protocol and Table 2 parameters. Products were purified using the Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and then DNA concentration was quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France).

Step 1. PCR amplification described in Figure 1, step 1, which contained primers and templates described in Table 2, was carried out with following PCR cycling conditions: one cycle of 94°C for 2 min, then 25 cycles of 94°C for15 s, 55°C for 30 s, 68°C for 100 s, and then 68°C for 10 min. After purification, the product was eluted in 50 µL recommended immobilization buffer (Ademtech).

Step 2. Ten microliters 1% streptavidin-covered bead solution were added to the totality of the purified amplification product from step 1 and incubated for 1 h at room temperature under gentle shaking. Beads were washed two times with 300 µL immobilization buffer and one time with water and suspended into 50 µL water. Suspension was heated for 5 min at 95°C, before ice cooling, allowing the recovery by magnetic separation of a supernatant containing only the nonbiotinylated strand. The single-stranded product solution was transferred into a clean tube.

Step 3. PCR amplification described in Figure 1, step 3, in accordance with Table 2 parameters, was performed with the same cycling conditions as in step 1 except for an elongation time of 10 s and the use of water to elute the purified product.

Step 4a and 4b. One nanogram of purified product from step 3 was added to PCRs 4a and 4b mixes, as described in Table 2. PCR cycles were the same as before except for an elongation time of 15 s for PCR 4a and 105 s for PCR 4b and the use of water to elute the purified product.

Step 5. Equimolar concentrations (corresponding to 1 ng of the larger product) from steps 4a and 4b were mixed together and with all PCR components except the enzyme (see

Table 1. Oligonucleotides Used in This Study

A1	5′-**CTAAATTAATTAA**ATGGAACTCAGCGTCCTCCTC-3′
A2	5′-**GATGGGCAGCGGCC**GGGGCCCTGGTGGGAGGCGG-3′
B1	5′-**CACCAGGCCCCC**GCCCTCTGCCCCTTTTGGGAAAC-3′
B2	5′-**GTACACCGTGAAG**ACGTCCCCATATTTCTCTCG-3′
C1	5′-**GAAATATGGGGACGT**CTTCACGGTACACCTGGGAC-3′
C2	5′-**GAAAGGTGGAAGACC**CTTCGGCGATTCTCTGTGAC-3′
D1	5′-**GAAAGGTGGAAGACC**CTTCGGCGATTCTCTGTGAC-3′
D2	5′-**CTCTTCCACCAG**ACACTGAGCCTCCTCCTGAATC-3′
E1	5′-**GAGGCTCAGTGT**CTGATAGAGGAGCTTCGGAAATC-3′
E2	5′-**GTAGCCAAAACG**TTTTCCAAAGACGATGGAGC-3′
F1	5′-**GTCTTTGGAAAA**CGATTCCACTACCAAGATCAAG-3′
F2	5′-**GGAGAAACTCGA**GATGAGTGAAAAAGTCTGGTAG-3′
G1	5′-**CTTCGCACTCATC**AGCTCTGTATTCGGCCAGCTG-3′
G2	5′-**GTGCCAGGAAAGT**ATTTCAAGAAGCCAGAGAAG-3′
H1	5′-**GCTTCTTGAAGT**ACTTTCCTGGGGCACACAGG-3′
H2	5′-**GAGCGCTGGGATC**CAGGGTTTCACGGTGCTTCTC-3′
I1	5′-**CAGGGAAACCCTG**GACCCCAGCGCCCCCAAGGAC-3′
I2	5′-**GTCTCCGTGCCGG**CAAAGAAGAGCGAGAGCGTG-3′
J1	5′-**CGCTCTTCTTCG**CTGGCACTGAGACCACCAGC-3′
J2	5′-**CATTTTGGCTCG**GTCATGAAGCTCTGGAGGGC-3′
K1	5′-**CTTCCCTTGACGAT**CGAGCCAAAATGCCATACAC-3′
K2	5′-**GTGACCATATGGG**GCACACCCATGGGGAGAAGG-3′
L1	5′-**CCATTGGGGTAC**CCCACATTGTCACCCAACAC-3′
L2	5′-**GCAGAGTGCAAT**ATGAGAAATACTTCTGTGTC-3′
M1	5′-**GAAGTATTTCCAAT**CCTGAGCACTGCTCTCCATG-3′
M2	5′-**CATTCTTCTTCAG**TGCCCCATTGGCATCCAGAAAG-3′
N1	5′-**GCCAATGGAGCT**CTGAAAAAGACTGAAGCTTTTATC-3′
N2	5′-**CACAGAGAAGTTC**TGGAGGATGGTGGTGAAGAAG-3′
O1	5′-**CACCATCCTGCA**GAACTTCTCCATGGCCAGCC-3′
O2	5′-**CTAGCTCAGCACCCTCA**GCGGGGCAGGAAGCGGATC-3′
5′-biot	5′-biotin-CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3′ Complementary to pM13 mp19 positive strand, located about 100 bp downstream of the polylinker
pGAL	5′-CCTTATACATTAGGTCCTTTGTAGC-3′ Specific of GAL10-CYC1 promoter
tPGK	5′-CTGGCAATTCCTTACCTTCC-3′ Specific of PGK terminator

Bolded part of primers A1 to O2 correspond to CYP2B11 sequences, while the remaining part corresponds to CYP2B6 sequences.

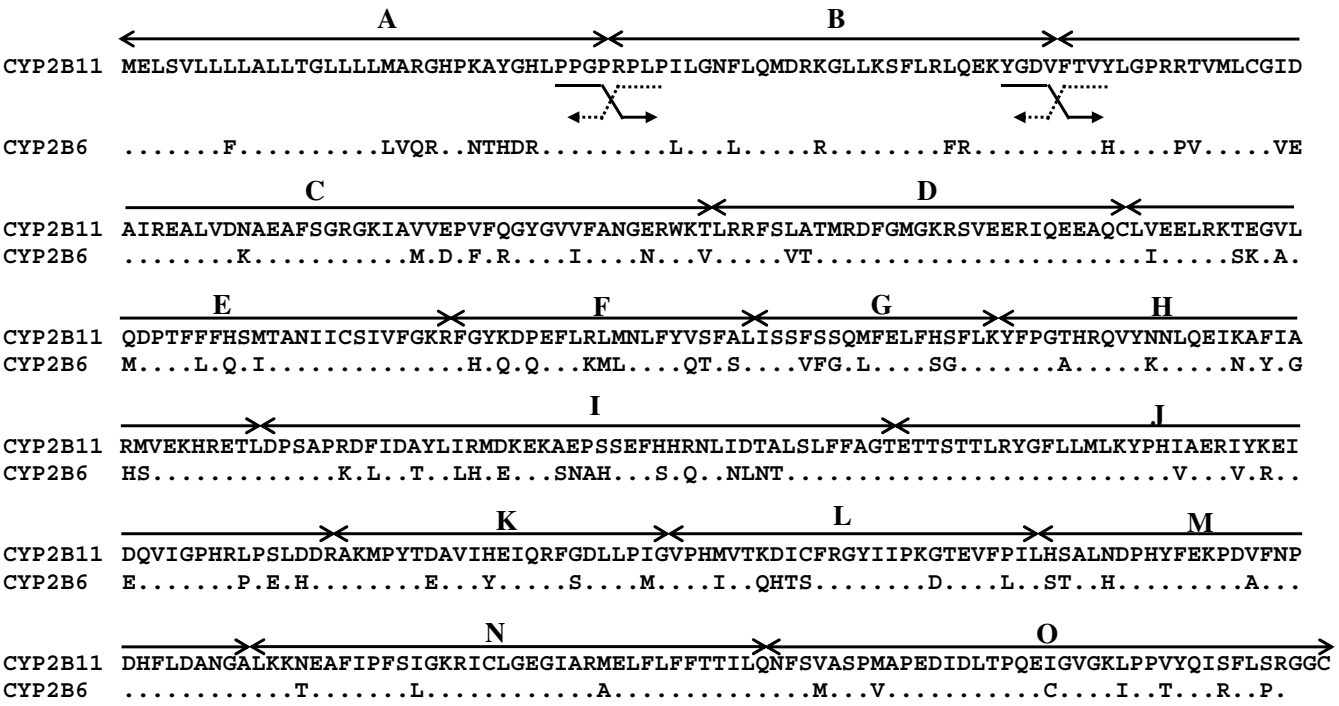


Figure 2. Amino acids alignment of CYP2B11 and CYP2B6 sequences. Arrows and letters above the sequence represent limits and labels of exchanged sequence fragments, respectively. Sequence extent and crossover points of oligonucleotides designed for chimera generation are illustrated by arrows under the first sequence line. Plain arrows indicate forward primers, and dotted arrows indicate reverse primers. This construction is identical for all the sequence fragments.

Table 2). The solution was incubated for 3 min at 94°C followed by 25 min at 60°C. Polymerase was then added, and the mixture was kept at 68°C during 105 s. Then, 25 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 90 s, and 68°C for 105 s were performed, followed by 10 min at 68°C.

Chimera Cloning

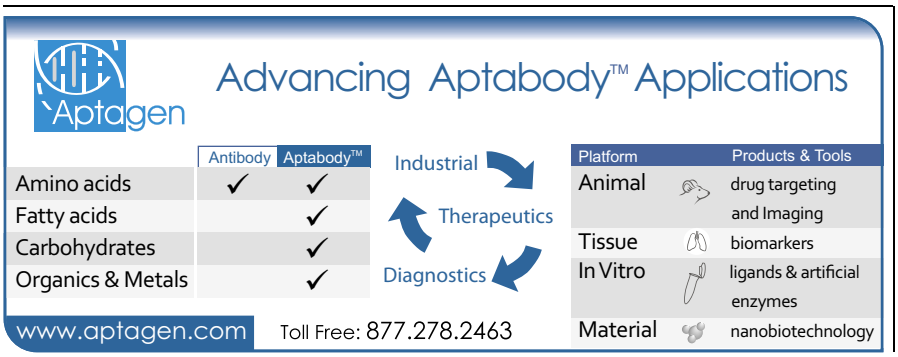
Generated products for chimeric P450s were cloned by homologous recombination with the expression vector pYeDP1–8-2 using gap repair in yeast as described in Reference 20. Expression cassette for this vector involves the *GAL10-CYC1* promoter and the *PGK* terminator sequence. Two marker genes, *URA3* for yeast and ampR for bacteria, were used for selection. Recombination occurred between the promoter and terminator flanking sequences of the chimera and the corresponding vector sequences. Cells were transformed with 500 ng final PCR amplification product and 100 ng *Bam*HI/*Eco*RI digested pYeDP1–8-2. After selection for uracile prototrophy of transformed yeast cells, total DNA of yeast clones was extracted (21) and used to transform *E. coli* using an ampicillin resistance selection. For each construction, plasmidic DNAs of six randomly picked *E. coli* clones were sequenced (GATC Biotech, Konstanz, Germany), and their structures checked.

RESULTS AND DISCUSSION

Chimera Construction

The developed chimeragenesis technique is illustrated in Figure 1, defining X as the donor and Y as the acceptor sequences, respectively. SIGNAL uses a first amplification to add an acceptor part upstream of the crossover point of the targeted chimera (step 1). The product is purified from parental template using a biotin-avidin system (step 2). The donor segment to be exchanged is flanked by short stretches of acceptor sequences using PCR (step 3). Resulting product is used to generate the two moieties of the targeted chimera (step 4). Finally, these two parts are assembled using a fusion PCR (step 5). A proof-of-principle is given for generation of mosaic structures between CYP2B11 (acceptor) and CYP2B6 (donor) ORFs. Used sequence fragments and primers are presented in Figure 2.

In step 1, specific primer hybridization was facilitated by the use of



a single-stranded template (using pM13mp19) for the donor sequence. The hybridization temperature was set to the lowest melting temperature (T_m) of all the used primers. A forward bipartite (crossover defining) primer and the biotinylated common reverse primer were used to amplify a biotinylated segment extending from the left-side crossover point to the end of the donor sequence template (see Figure 1). Typical amplification patterns for this step are presented (Figure 1A) and exhibit the expected size. Some nonspecific side products were observed but at a very low concentration compared with desired products. In step 2, each biotinylated product from step 1 was bound to streptavidin-covered magnetic beads. Single-stranded donor template, which is not biotinylated, was removed during this step, thus reducing the potential parental contamination of the targeted chimera. Furthermore, this process permitted to keep only the useful product strand. This single strand was used for step 3, in which the exchanged donor fragment itself, flanked by a dozen of acceptor base pairs, is amplified (see Figure 1). In steps 4a and 4b, the double-stranded amplification product from step 3 was used as a template. It was mixed with single-stranded templates consisting in common sequences placed either upstream (4a) or downstream (4b) of the acceptor sequence. This step was designed to avoid the possibility of parental sequence amplification in the following PCR where the two outermost primers were used simultaneously. The use of single-stranded templates improved the specific hybridization of primers and templates together. These steps led separately to the amplification of both chimera moieities (see Figure 1, C and D, for steps 4a and 4b, respectively). In step 5, PCR was carried out to fuse both amplification products from steps 4 through hybridization of their complementary sequences at the position of the exchanged fragment. For this fusion PCR, it was critical to use mole-to-mole ratios of templates. The PCR mixture without enzyme was heated at a denaturing temperature and then slowly cooled to hybridization temperature to ensure an efficient long fragment hybridization. All the resulting PCR amplification products exhibited the same and expected size, corresponding to the full-length chimera (Figure 1E).

This method represents the best compromise between efficiency, reduction of parental contamination, and number of PCR cycles. Some PCR steps could be fused together, but generally with detrimental effects on results.

The two outermost primers used for the fusion PCR included flanking sequences homologous to the promoter and terminator part of the yeast expression vector. This allowed an easy in vivo cloning of chimeras using homologous recombination in yeast. Alternatively, the Gateway system could also be used, as suitable restriction sites introduced in primers for classical cloning, giving high flexibility to the approach.

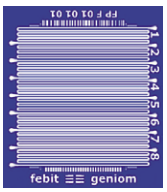
Cloning and Sequencing

Following yeast transformation and selection, DNA extraction and subcloning were performed in *E. coli*. For each construct, sequencing of five to six clones was found sufficient to secure the isolation of at least one fully correct sequence. A very low rate of parental contamination was observed in our approach compared with the sequence-independent site-directed chimeragenesis (SISDC) method (10). Contamination was never detected for the

febit's miRNA Profiling Service

febit offers an expert miRNA profiling service including consulting, raw data generation and bioinformatic analysis.

- **FAST**
  from data submission to bioinformatic report in 2–3 weeks
- **UP-TO-DATE**
  content covering the latest miRBase version
- **EASY**
  simply send us your samples and we will provide you with reliable results
- **CUSTOMIZATION**
  including use of predicted, mutated, or proprietary miRNAs free of charge
- **AFFORDABLE**
  competitively priced, cost-effective means to obtain miRNA profiles



GENIOM BIOCHIP FACTS

- light-activated probe synthesis within microfluidic channels
- variable probe length 18–60 mer
- 8 arrays per biochip
- up to 15,624 features per array
- enables parallel hybridization of up to 8 different samples

» PLEASE CONTACT US FOR DETAILS

febit

READ, WRITE, UNDERSTAND THE CODE OF LIFE

Europe: phone +49 6221 6510-300 · www.febit.eu · info@febit.eu
Americas: phone +1 781 391 4360 · www.febit.com · info@febit.com

Table 2. PCR Parameters

Step Number	1	3	4a	4b	5
	Templates (ng)				
2B6/M13	1				
2B11p/M13			1		
2B11t/M13				1	
Product from previous PCR		1	1	1	Variable
	Primers (pmol)				
A1	10	10		10	
A2		10	10		
5′-biot	10				
pGAL			10		10
tPGK				10	10

donor sequence and represents less than 15% of clones for the acceptor sequence. This illustrates that the use of the streptavidin-biotin system efficiently removes the donor template. Moreover, alternate approaches using double-stranded instead of single-stranded templates were generally found to generate a great number of side products due to unwanted initiation of amplification by partially extended sequences from the complementary strand. This leads to strong increase in parental contamination and in the formation of undesired sequences needing the sequencing of a large amount of clones to isolate expected recombinants. The observed residual contamination by parental acceptor sequence can result from steps 4a and 4b and could be avoided by adding a gel purification step between steps 4 and 5, although this could be problematic for automation. Concerning the observation of a low frequency of point mutations in our approach, it is classically attributed to polymerase-generated copy error and could be limited by use of higher fidelity enzymes.

Conclusion

We successfully applied SIGNAL for the generation of a library of chimera with predefined crossover points between two CYPs. SIGNAL presents significant advantages over previously described chimeragenesis techniques used for structure-function relationship analysis. Indeed, compared with classical sequence-independent (14–16) or not (4–8) shuffling methods, our approach allows the design of chimeras with defined junction points. This greatly facilitates the identification by multivariate analysis (22) of structure blocks responsible for functional control. In contrast to previously described methods for sequence blocks swapping (11–13), SIGNAL is fully sequence-independent both at the protein and DNA level. Compared with the SCHEMA-related approaches (9,10), our method differs by the control of parental contamination through the use of single-stranded templates and magnetic beads-based purification. SIGNAL places itself between site-directed and random mutagenesis approaches and allows the generation of highly tuneable diversity that relies on the user's choice with very few constraints. Created libraries can be of various sizes, and their controlled and ordered combinatorial structure reduces requirement for high-throughput functional selection, significantly. At the same time, SIGNAL can be used to acquire information useful to target random mutagenesis approaches by pinpointing crucial structural modules being implicated in the protein activities. This paper describes, as an example, the construction of 15 chimeras, but the technique could be adapted to create much larger libraries. Indeed, SIGNAL is relatively simple to carry out and is well-suited to be robotized. This promises to constitute a useful tool for the study of structure function relationship and for activity optimization.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC Grant 4011). We thank Gilles Truan for his help during the modeling phase.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. **Roberts, R.J.** 2004. Identifying protein function—a call for community action. PLoS Biol. *2*:E42.
2. **Meyer, A., R. Pellaux, and S. Panke.** 2007. Bioengineering novel in vitro metabolic pathways using synthetic biology. Curr. Opin. Microbiol. *10*:246-253.
3. **Bloom, J.D., M.M. Meyer, P. Meinhold, C.R. Otey, D. MacMillan, and F.H. Arnold.** 2005. Evolving strategies for enzyme engineering. Curr. Opin. Struct. Biol. *15*:447-452.
4. **Orr-Weaver, T.L. and J.W. Szostak.** 1983. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *80*:4417-4421.
5. **Nogami, T., T. Mizuno, and S. Mizushima.** 1985. Construction of a series of ompF-ompC chimeric genes by in vivo homologous recombination in *Escherichia coli* and characterization of the translational products. J. Bacteriol. *164*:797-801.
6. **Crameri, A., S.A. Raillard, E. Bermudez, and W.P. Stemmer.** 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Nature *391*:288-291.
7. **Abécassis, V., D. Pompon, and G. Truan.** 2000. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. Nucleic Acids Res. *28*:E88.
8. **Sun, J., J.A. Katzenellenbogen, H. Zhao, and B.S. Katzenellenbogen.** 2003. DNA

shuffling method for generating estrogen receptor alpha and beta chimeras in yeast. BioTechniques *34*:278-288.
9. **Meyer, M.M., J.J. Silberg, C.A. Voigt, J.B. Endelman, S.L. Mayo, Z.G. Wang, and F.H. Arnold.** 2003. Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination. Protein Sci. *12*:1686-1693.
10. **Hiraga, K. and F.H. Arnold.** 2003. General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis. J. Mol. Biol. *330*:287-296.
11. **Rosic, N.N., W. Huang, W.A. Johnston, J.J. DeVoss, and E.M. Gillam.** 2007. Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling. Gene *395*:40-48.
12. **Johnston, W.A., W. Huang, J.J. De Voss, M.A. Hayes, and E.M. Gillam.** 2007. A shuffled CYP1A library shows both structural integrity and functional diversity. Drug Metab. Dispos. *35*:2177-2185.
13. **Cartwright, A.M., E.K. Lim, C. Kleanthous, and D.J. Bowles.** 2008. A kinetic analysis of regiospecific glucosylation by two glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*: domain swapping to introduce new activities. J. Biol. Chem. *283*:15724-15731.
14. **Ostermeier, M., J.H. Shim, and S.J. Benkovic.** 1999. A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. Nat. Biotechnol. *17*:1205-1209.
15. **Lutz, S., M. Ostermeier, G.L. Moore, C.D. Maranas, and S.J. Benkovic.** 2001. Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *98*:11248-11253.
16. **Sieber, V., C.A. Martinez, and F.H. Arnold.** 2001. Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. Nat. Biotechnol. *19*:456-460.
17. **Truan, G., C. Cullin, P. Reisdorf, P. Urban, and D. Pompon.** 1993. Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5. Gene *125*:49-55.
18. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning, 2nd ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
19. **Gervot, L., B. Rochat, J.C. Gautier, F. Bohnenstengel, H. Kroemer, V. de Berardinis, H. Martin, P. Beaune, and I. de Waziers.** 1999. Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. Pharmacogenetics *9*:295-306.
20. **Pompon, D. and A. Nicolas.** 1989. Protein engineering by cDNA recombination in yeasts: shuffling of mammalian cytochrome P-450 functions. Gene *83*:15-24.
21. **Hoffman, C.S. and F. Winston.** 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene *57*:267-272.
22. **Urban, P., G. Truan, and D. Pompon.** 2008. High-throughput enzymology and combinatorial mutagenesis for mining cytochrome P450 functions. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. *4*:733-747.

Received 20 June 2008; accepted 4 August 2008.

Address correspondence to Denis Pompon, Laboratoire d'Ingénierie des Protéines Membranaires, CGM—CNRS, Bâtiment 23B, 1 avenue de la Terrasse, F91190 Gif-sur-Yvette, France. e-mail: pompon@cgm.cnrs-gif.fr

To purchase reprints of this article, contact: Reprints@BioTechniques.com

4.4. Discussion et conclusion

4.4.1. Comparaison des méthodes de construction de chimères

Créer des chimères entre deux ou plusieurs protéines parentales peut être effectué de multiples façons. La méthode choisie dépend en grande partie des informations recherchées par le biais de cette création de chimères. Nous avons testé deux méthodes afin de générer des chimères, possédant des points de jonction choisis et définis, entre les CYPs 2B11 et 2B6. La première méthode enzymatique était dépendante des séquences parentales et faisait intervenir des enzymes de restriction, la deuxième méthode SIGNAL était indépendante des séquences parentales et utilisait des oligonucléotides.

Nous avons très vite observé les limites imposées par la méthode enzymatique, les sites de restriction existant en nombre limité. Les mutations silencieuses à introduire peuvent de plus être coûteuses à réaliser et des problèmes de contamination parentale ont été observés

Toutes ces déductions ont donc été prises en compte dans la mise au point de la deuxième méthode de chimérogenèse pour la même application, SIGNAL.

La différence entre SIGNAL et la méthode enzymatique est l'utilisation d'oligonucléotides, synthétisés facilement selon le désir de l'utilisateur, et permettant de placer les points de jonction virtuellement à n'importe quelles positions sur les séquences parentales. De plus, cette technique permet également de travailler avec des séquences de faible homologie, les oligonucléotides utilisés forçant l'hybridation des séquences à des endroits particuliers en ajoutant de petits fragments de séquence judicieusement placés qui servent d'attaches lors des amplifications. Différents processus permettent également d'éviter les contaminations parentales, notamment l'usage de matrices parentales sur lesquelles ne peuvent se fixer qu'un seul oligonucléotide sur les deux utilisés lors de la PCR finale. Ceci réduit drastiquement la présence de contamination par des séquences parentales (présence de 15% de séquence acceptrice seulement) dans le mélange final, ce qui est une amélioration par rapport aux précédentes méthodes décrites pour générer des chimères à points de jonction définis (Hiraga and Arnold 2003 ; Meyer, Silberg et al. 2003).

Toutes les chimères choisies ont été synthétisées correctement par la technique SIGNAL, à part le fait que certaines mutations ponctuelles ont été générées lors de l'expérience, ce qui est *a priori* plutôt du à la polymérase utilisée qu'à la méthode elle-même. Il pourrait ainsi être intéressant de réitérer l'expérience réalisée avec une polymérase différente, tel que cela avait été fait pour la première méthode.

Suite à ces expériences, les mutations ponctuelles générées par la méthode de chimérogenèse ont été corrigées afin d'obtenir les séquences de chimères désirées, dont l'activité a été étudiée (protocole décrit en annexe I).

4.4.2. Méthode SIGNAL : applications

SIGNAL est également une technique adéquate pour la réalisation de chimères dont les points de jonction ont été déterminés par l'algorithme SCHEMA dont les avantages ont été décrits dans l'introduction. Mais pour l'instant, les techniques utilisées pour la génération de chimères à points de recombinaison fixés sont le plus souvent limitées à des séquences de forte homologie (Cartwright, Lim et al. 2008) ou, comme celles associées à l'algorithme SCHEMA et décrites dans l'introduction, elles sont relativement difficiles à réaliser (Hiraga and Arnold 2003; Meyer, Silberg et al. 2003). D'ailleurs, une perspective possible serait d'utiliser SCHEMA afin de déterminer les points de jonction adéquats pour obtenir le maximum de protéines fonctionnelles et de construire ensuite les chimères déterminées avec la méthode SIGNAL.

SIGNAL permet d'utiliser facilement l'une ou l'autre des séquences parentales comme donneuse ou acceptrice. En effet, un des buts de la mise au point de cette technique était d'ailleurs de l'utiliser afin d'introduire dans la séquence du CYP2B6, accepteur, des modules de CYP2B11, donneur, après avoir déterminé, grâce à notre première banque de chimères, les modules de CYP2B11 essentiels pour la bonne affinité de cette protéine vis-à-vis de la CPA. Ceci permettrait alors de construire un P450 optimisé pour la métabolisation de la CPA tout en conservant une architecture proche de l'enzyme humaine. C'est pour ceci que les chimères générées par SIGNAL ont été clonées dans un vecteur d'expression de levure afin de pouvoir tester leur activité vis-à-vis de la CPA dans cet organisme modèle.

Une banque de chimères à points de jonction définis a donc été générée puis clonée dans un vecteur d'expression de levure après la mise au point de la technique de chimérogenèse SIGNAL, indépendante des séquences parentales choisies et utilisant des oligonucléotides et des amplifications successives. Après correction des éventuelles mutations ponctuelles détectées et clonage, ces chimères ont été transformées dans la levure, où leur activité a été testée vis-à-vis de différents substrats, ce qui fera l'objet de la deuxième partie de ce mémoire.

5. Partie 2 :

Relations structure-fonction :

CYP2B11, CYP2B6 et chimères

5.1. CONTEXTE 127

5.2. REALISATION 127

5.3. RESULTATS 130

5.3.1. Correction des données 130

5.3.2. Calcul d'erreur sur les constantes enzymatiques 130

5.3.3. Considérations sur le K_m 133

5.3.4. Comparaison des constantes enzymatiques 136

5.4. DISCUSSION 141

5.4.1. Canaux du CYP2B6 141

5.4.2. Topologie membranaire des CYPs 2B11 et 2B6 141

5.4.3. Relations entre K_m et structure tridimensionnelle 144

*5.4.4. Chimères présentant un K_m^C proche de celui du CYP2B11 : **A, E, F, J, K, N et O** 145*

*5.4.5. Chimères présentant un K_m^C intermédiaire : **B, H, M et G** 148*

*5.4.6. Chimères inactives : **D, I et L** 157*

5.4.7. Analyse globale des chimères 160

5.5. CONCLUSIONS 164

5.1. Contexte

Observer l'effet de mutations sur la fonctionnalité d'un enzyme n'est pas un concept nouveau et de nombreuses études de relation structure-fonction impliquant des P450s de mammifères ont déjà mis en évidence l'importance de certains acides aminés pour la spécificité ou l'activité des enzymes (Domanski and Halpert 2001 ; Spatzenegger, Liu et al. 2003 ; Chen, Lin et al. 2004). Mais la plupart des études réalisées consistaient en des méthodes de mutation dirigée, effectuées sur la base d'études structurales antérieures et aboutissant à la modification de quelques acides aminés au total. En effet, peu d'études de mutagenèse et de chimérogenèse à moyen ou haut débit ont été réalisées sur des P450s mammifères (Parikh, Josephy et al. 1999 ; Kumar and Halpert 2005), l'expression et le tri fonctionnel des mutants étant une étape limitante lors de l'étude de ces enzymes membranaires (Domanski and Halpert 2001).

Donc, afin de déterminer plus finement les acides aminés responsables de la différence d'activité observée entre les CYPs 2B6 et 2B11, notre approche a ainsi consisté en la construction de chimères à point de jonction définies entre ces deux enzymes (voir Partie 1).

Ainsi, l'étude des chimères générées semble appropriée pour la détermination des acides aminés éloignés du site actif et influant sur l'activité du CYP2B11 et du CYP2B6 vis-à-vis de la CPA, les mutations générées se situant tout au long de la séquence protéique.

5.2. Réalisation

Les protocoles détaillés sont décrits en Annexe I.

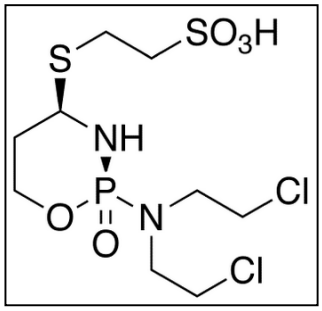
Une fois les séquences chimériques générées et clonées dans le plasmide d'expression de levure pYeDP1-8 selon le protocole exposé en Partie 1, les 17 plasmides, contenant les différentes séquences chimériques et parentales, sont transformés dans la levure W(R) (Urban, Truan et al. 1993). Cette souche est optimale pour l'expression de P450s puisqu'elle surexprime la P450 réductase de levure sous le contrôle du même promoteur que celui utilisé dans pYeDP1-8. Des microsomes, contenant un rapport optimisé entre l'enzyme et sa réductase, sont ensuite préparés, permettant d'évaluer les caractéristiques biochimiques des enzymes parentaux et des chimères.

Les activités CPA hydroxylase des 15 chimères, correspondant à des échanges de segments uniques, et des 2 parents sont mesurées en utilisant un format 96 puits et un robot pipeteur, permettant un débit relativement rapide des mesures. Après mise en présence de la gamme de concentration de substrat avec les microsomes durant différents temps, le métabolite 4-hydroxyl CPA (4-OH CPA) obtenu, peu stable, est dérivatisé par de la dinitrophenylhydrazine afin de prolonger sa durée de vie (Kalhorn, Howald et al. 2006). Ceci permet une meilleure analyse des plaques 96 puits par Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (CLHP-SM) et à un détecteur UV.

Une référence interne, l'acide coumarique, est ajoutée au mélange avant injection pour corriger les différentes erreurs de mesure et calibrer la dérive du détecteur de masse.

Une courbe de calibration spécifique est réalisée en utilisant un précurseur du 4-OH CPA, l'ASTA Z 7557 ou mafosfamide (Figure 48), qui est un sel de cyclohexylamine du mafosfamide, qui se décompose spontanément en 4-OH CPA en solution aqueuse (Niemeyer, Engel et al. 1984). Après intégration de l'aire des pics de chromatographie, la correction des données (exposées dans le paragraphe suivant), et le calcul des caractéristiques enzymatiques s'effectuent grâce à un programme écrit dans l'environnement logiciel [R] (http://www.r-project.org/). En parallèle, l'activité 7-ethoxytrifluoromethylcoumarine (7-EFC) deethylase des P450s a été mesurée.

Figure 48. Formule du mafosfamide



Nos variants consistant en des fragments de 2B6 insérés dans un squelette de CYP2B11, nous recherchons en priorité les fragments pour lesquelles une baisse de l'activité relative entre la CPA et l'EFC du P450 est observée. En effet, puisque souvent une combinaison d'acides aminés est nécessaire à l'établissement d'une fonction spécifique, il est plus facile de réduire une activité spécifique en changeant quelques acides aminés, plutôt que de l'augmenter (Domanski, Schultz et al. 1999).

Ensuite, des modèles structuraux des chimères sont modélisés à partir de la structure "fermée" du CYP2B4 afin de mettre en évidence leurs structures tridimensionnelles. Il est ainsi possible de localiser les acides aminés différents entre les CYPs 2B11 et 2B6 dans les fragments dont l'échange présente les résultats d'activité les plus intéressants.

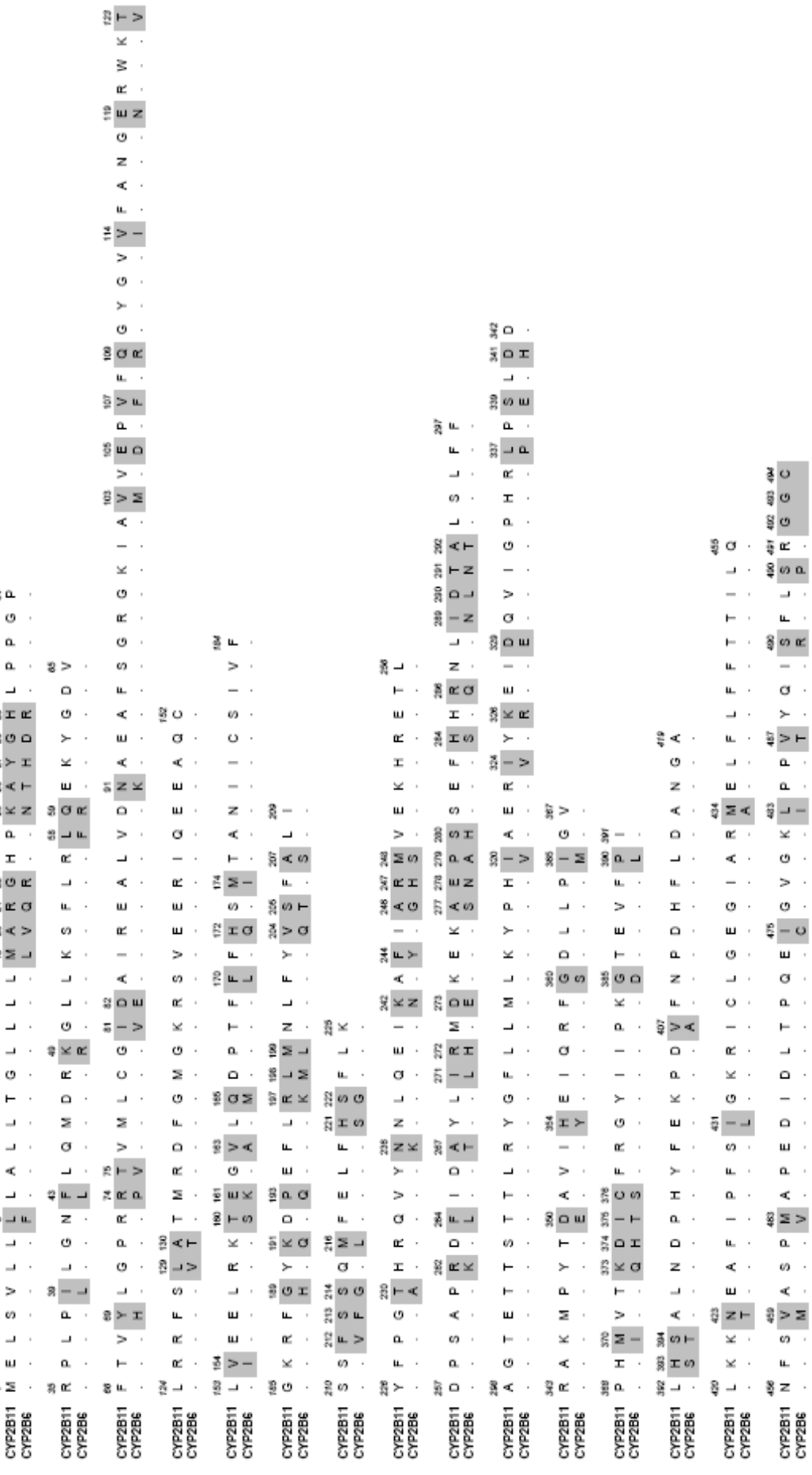


Figure 49. Séquences protéiques des différents modules structuraux échangés dans les différentes chimères. Les numéros en italique au-dessus des séquences indiquent le début et la fin de chaque module, les autres numéros indiquent les acides aminés différents entre le CYP2B6 et le CYP2B11, surlignés en gris.

5.3. Résultats

5.3.1. Correction des données

Les activités CPA hydroxylase de 15 chimères, incluant les mutations ponctuelles indiquées sur la Figure 49, et des 2 parents sont étudiées après expression des protéines dans la levure. En dehors de la courbe de calibration, toutes les opérations décrites ici sont effectuées de façon indépendante pour chaque plaque 96 puits réalisée. Le processus de correction des données mis au point pour calculer la quantité q de 4-OH CPA (en nmol) produite dans chaque puits est exposé en Figure 50. Le calcul des constantes enzymatiques des chimères et des parents, présentées dans le Tableau 4, est exposé en Figure 51.

5.3.2. Calcul d'erreur sur les constantes enzymatiques

En ce qui concerne les erreurs expérimentales correspondantes aux paramètres enzymatiques des chimères et des parents, leurs valeurs ont été estimées en prenant en compte différentes sources possibles d'erreur :

- Une erreur de 10 % de la valeur finale du K_m^C, du k_2^C et du K_m^E, correspondant aux erreurs expérimentales de pipetage, a été comptabilisée.
- Une estimation de l'erreur d'interprétation des résultats donnés par le logiciel intégrant automatiquement les aires des pics de chromatographie a été réalisée pour chaque plaque analysée.
- Une estimation de l'erreur issue de la mesure spectrale de la concentration en P450 des microsomes a été effectuée, et ajoutée aux valeurs d'erreur calculées pour la mesure du k_2^C.
- Une erreur de 10% de la valeur finale de la concentration en protéines des microsomes, correspondant aux erreurs de pipetage, a été comptabilisée et incluse dans le calcul du contenu en P450 des microsomes.

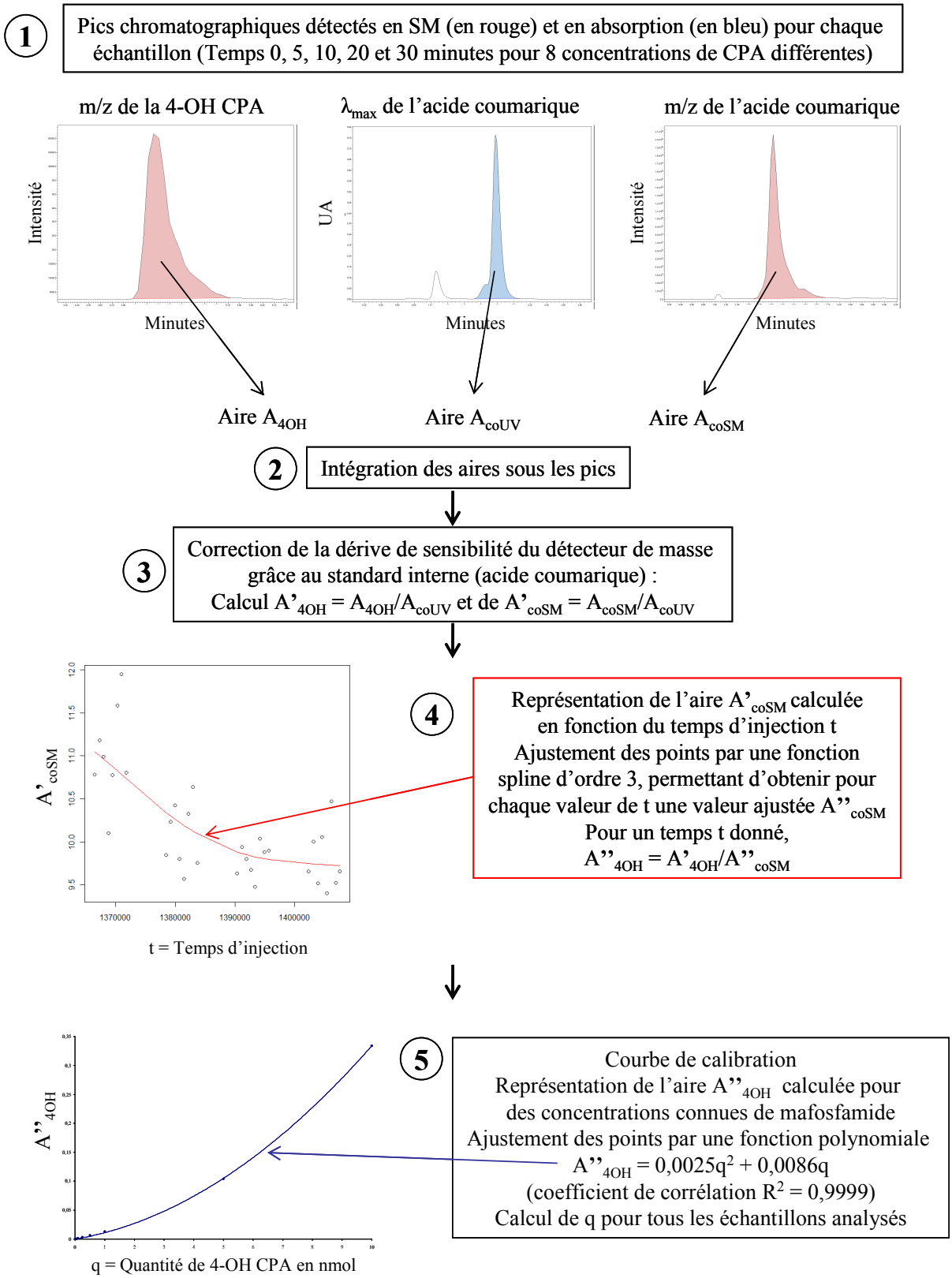


Figure 50. Processus de correction des données analytiques grâce à un programme écrit dans l'environnement logiciel R afin d'obtenir la valeur de la quantité de métabolite 4-OH CPA produite par puits la plus précise possible. SM = spectrométrie de masse ; λ_{max} = longueur d'onde à laquelle le maximum d'absorption de l'acide coumarique est observé.

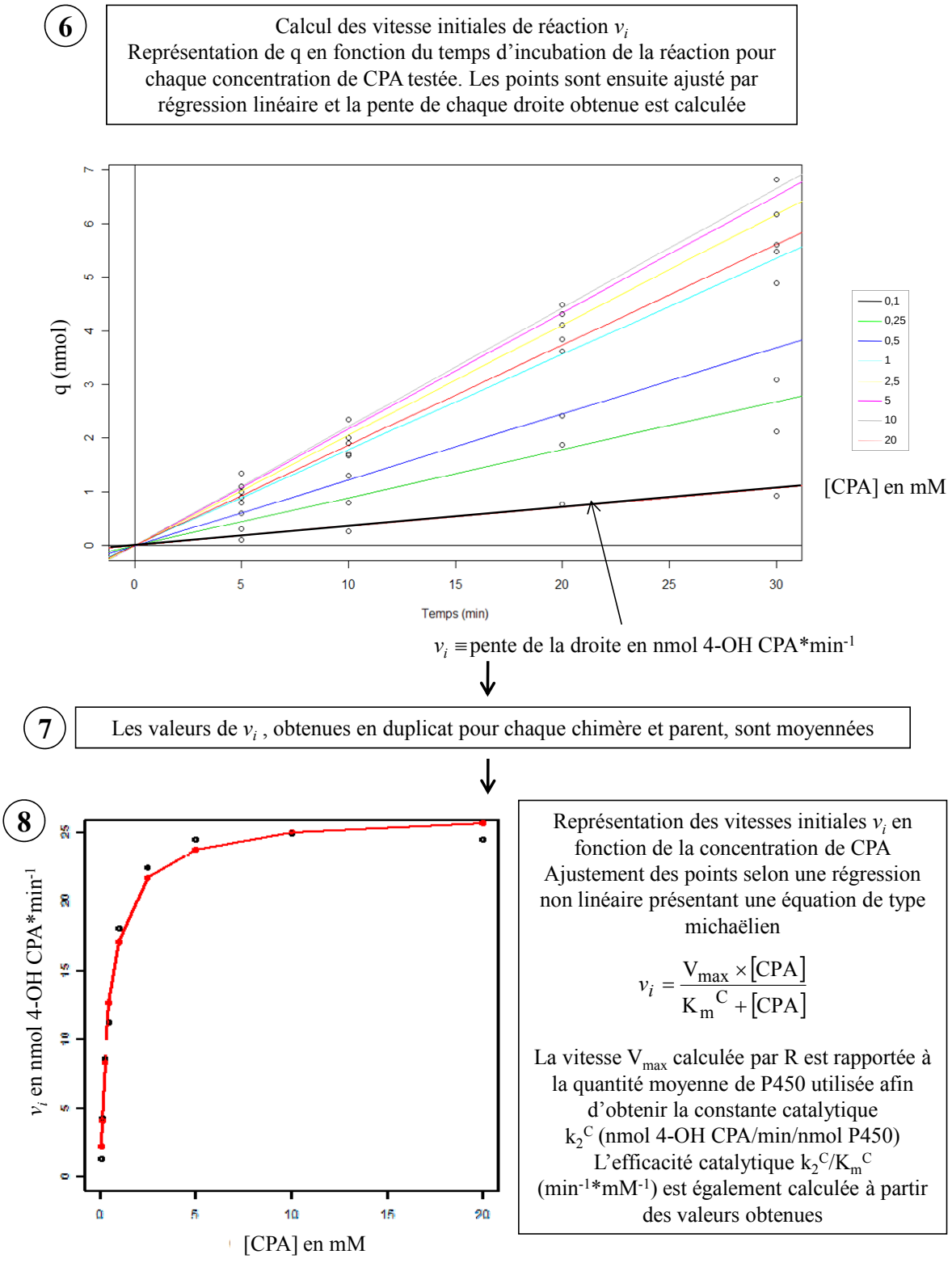


Figure 51. Calcul des constantes de Michaëlis, constantes catalytiques et efficacité catalytique pour les chimères et les parents en utilisant un programme écrit dans l'environnement logiciel R

5.3.3. Considérations sur le K_m

L'évaluation de l'activité CPA hydroxylase a été réalisée par mesure des vitesses initiales des enzymes parentaux et chimériques. Le travail a été effectué en présence d'un excès de substrat, après vérification de l'absence de produit au temps zéro. Il a été observé que les valeurs de constante catalytique calculées pour l'activité CPA hydroxylase étaient relativement élevées pour les deux enzymes parentaux. Ceci laisse à penser qu'il est peu probable, en considérant la limitation constituée par les transferts d'électrons dans le P450, qu'il soit possible d'obtenir des constantes de vitesse beaucoup plus élevées que celles qui ont été calculées pour ces P450s. Ainsi, lors du calcul des constantes enzymatiques, il a été considéré que les enzymes chimériques et parentaux présentaient une cinétique michaëlienne pour la métabolisation de la CPA, c'est-à-dire que l'étape limitante de la réaction enzymatique était celle de la formation du produit. Ceci équivaut à considérer un schéma réactionnel de ce type (les lettres E, S et P représentent respectivement l'enzyme, le substrat et le produit) :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Dans ce cadre, la constante de Michaëlis K_m est définie comme :

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1}$$

K_s représente ici la constante d'équilibre de la première étape réactionnelle, c'est à dire la constante de dissociation du complexe ES. Cette constante traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat. En effet, lorsque K_s diminue, cela implique que la constante de vitesse k_1 de formation du complexe ES augmente ; ou que la constante de vitesse k_{-1} de dissociation du complexe ES diminue.

La valeur de K_m traduit donc deux caractéristiques de la réaction enzymatique : l'affinité de l'enzyme pour son substrat (K_s) et la vitesse de formation du produit (k_2 constante catalytique). Or, la deuxième étape réactionnelle a été définie comme limitante, ce qui revient à postuler que k_1 est très supérieur au turnover (TN) k_2, et donc que le terme k_2/k_1 est négligeable par rapport au K_s. Il est alors possible de considérer la valeur du K_m comme équivalente à celle du K_s. Le K_m reflète donc majoritairement l'affinité de l'enzyme pour le substrat, et les changements de constante catalytique k_2 ne possèdent pas d'influence sur la valeur du K_m.

Tableau 4.Quantités de P450 et constantes enzymatiques pour les CYPs 2B11 et 2B6 et les 15 chimères. Chaque mesure d'activité CPA hydroxylase a été réalisée deux fois. N.D. = non déterminé

Enzymes	Microsomes		Cyclophosphamide			7-Ethoxy-4-trifluoromethyl coumarine
	Concentration en P450 (µM)	Teneur spécifique en P450 (pmol/mg)	K_m^C (mM)	k_2^C (min^{-1})	k_2^C/K_m^C ($min^{-1}.mM^{-1}$)	K_m^E (µM)
2B11	10 ± 0,5	388 ± 19	0,07 ± 0,01	55 ± 11	784 ± 277	1,2 ± 0,1
2B6	6 ± 0,3	281 ± 13	3,9 ± 0,6	36 ± 7	9 ± 3	0,8 ± 0,06
A	5 ± 0,2	74 ± 4	0,06 ± 0,01	68 ± 14	1126 ± 394	1,2 ±0,1
B	6 ± 0,5	100 ± 9	0,7 ± 0,2	19 ± 6	27 ± 14	4,6 ± 0,7
C	2 ± 0,2	13 ± 2	4,6 ± 1	2 ± 0,8	0,5 ± 0,3	N.D.
D	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E	22 ± 1	301 ± 15	0,1 ± 0,02	23 ± 6	233 ± 105	2,4 ± 0,06
F	4 ± 0,2	178 ± 11	0,1 ± 0,02	75 ± 16	751 ± 271	1 ± 0,1
G	1 ± 0,1	18 ± 2	1,2 ± 0,2	66 ± 18	55 ± 23	0,4 ± 0,03
H	2 ± 0,2	25 ± 2	0,3 ±0,05	28 ± 6	93 ± 35	1,8 ± 1,2
I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
J	1 ± 0,3	9 ± 2	0,1 ± 0,02	33 ± 12	330 ± 165	N.D.
K	3 ± 0,3	58 ± 6	0,06 ± 0,01	33 ± 9	545 ±225	1,8 ± 0,3
L	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M	8 ± 0,4	101 ± 5	0,2 ± 0,03	40 ± 8	198 ± 69	2,9 ± 0,6
N	3 ± 0,1	78 ± 4	0,09 ± 0,01	41 ± 8	459 ± 160	N.D.
O	13 ± 0,6	213 ± 11	0,05 ± 0,01	29 ± 6	574 ± 201	0,4 ±0,08

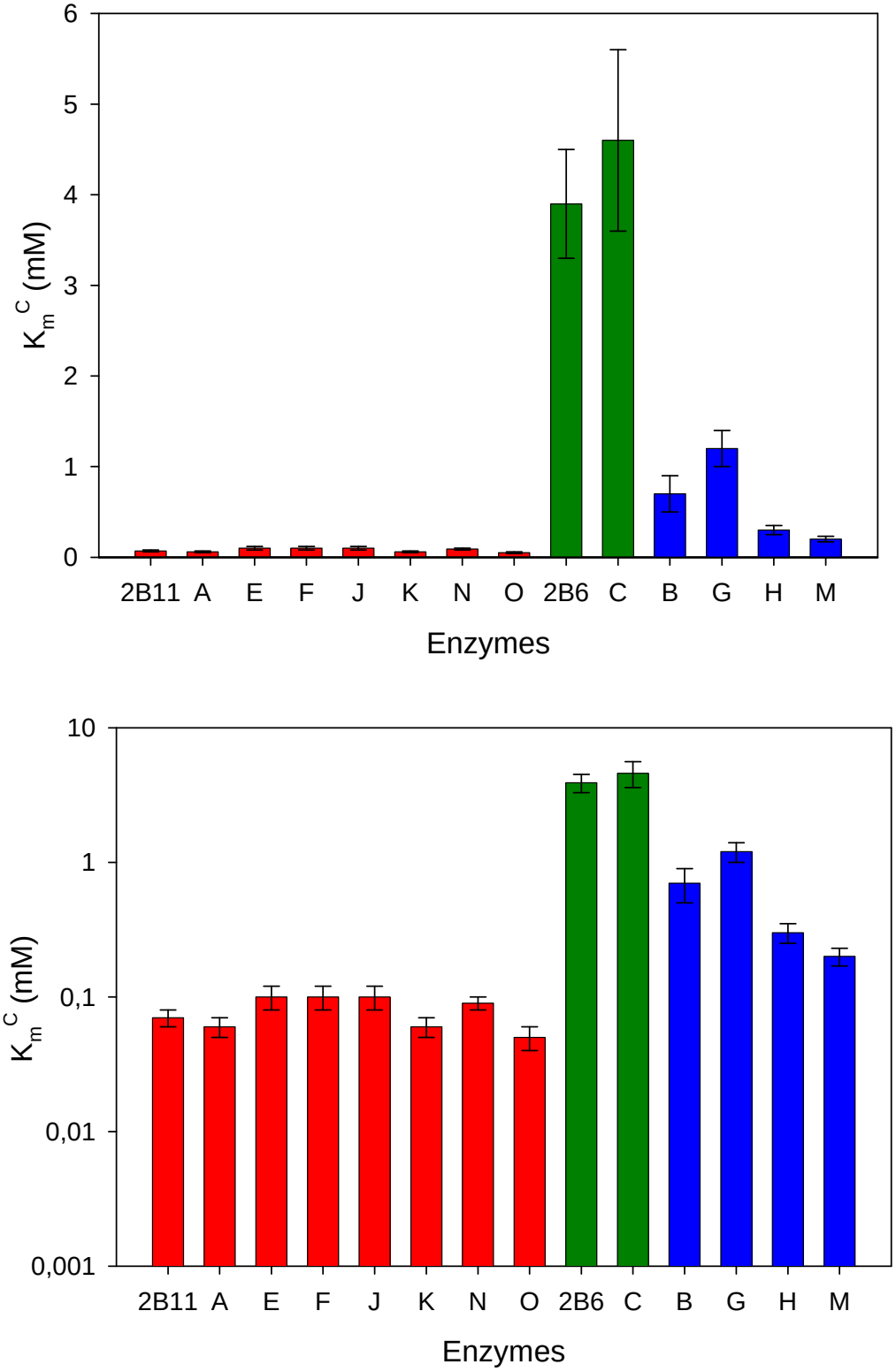


Figure 52. Valeurs de K_m^C des enzymes parentaux et des chimères. Dans toutes les figures, les barres rouges et vertes correspondent respectivement aux valeurs de K_m^C du CYP2B11 et du CYP2B6, ainsi que celles des chimères qui leur sont proches. Dans toutes les figures, les barres bleues représentent les chimères dont le K_m^C présente une valeur intermédiaire à celles des deux parents. Les figures du haut et du bas comportent respectivement des échelles linéaire et logarithmique.

5.3.4. Comparaison des constantes enzymatiques

5.3.4.1. Constante de Michaëlis des enzymes vis-à-vis de la CPA : K_m^C

L'activité CPA hydroxylase des CYPs 2B6 et 2B11 avait déjà été étudiée auparavant mais la plupart du temps dans des systèmes d'expression et des reconstitutions de "systèmes P450" différents du nôtre (Chang, Weber et al. 1993 ; Gervot, Rochat et al. 1999 ; Roy, Yu et al. 1999 ; Huang, Roy et al. 2000 ; Chen, Lin et al. 2004 ; Ekins, Iyer et al. 2008 ; Nguyen, Tychopoulos et al. 2008). Il est donc difficile de comparer les valeurs ayant été obtenues lors de notre étude avec ces diverses valeurs. Seule l'étude de Nguyen et al sur le CYP2B6 (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) a été effectuée dans des conditions similaires aux nôtres, la valeur de K_m obtenue vis-à-vis de la CPA étant proche de celle que nous observons. En ce qui concerne le CYP2B11, la valeur du K_m (Tableau 4) est du même ordre de grandeur que celles obtenues précédemment (Chen, Lin et al. 2004).

Pour toutes les études réalisées précédemment, il a été admis que le CYP2B11 présentait un faible K_m vis-à-vis de la CPA, alors que le CYP2B6, au contraire, montrait un K_m supérieur au mM (Jounaidi, Chen et al. 2006). Lors de nos expériences, le CYP2B11 présente en effet un K_m environ 50 fois inférieur à celui du CYP2B6 (Tableau 4).

Quant aux chimères, trois profils se détachent au niveau de l'affinité des enzymes pour la CPA (Figure 52). Les chimères A, E, F, J, K et N possèdent un K_m^C proche de celui du 2B11 (CYP2B11 : 0.07 mM; chimères : 0,06 à 0,1 mM). La chimère C se rapproche du CYP2B6 (CYP2B6 : 3.9 mM; C : 4,6 mM). Les chimères B, G, H et M présentent des valeurs intermédiaires (0,2 à 1,2 mM), différentes de chacun des parents.

5.3.4.2. Constante catalytique de l'activité CPA hydroxylase des enzymes : k_2^C

Le CYP2B6 (36 min^{-1}) présente une constante catalytique inférieure à celle du CYP2B11 (55 min^{-1}) pour l'activité CPA hydroxylase (Tableau 4). Dans l'ensemble, les valeurs de k_2^C de tous les enzymes sont beaucoup plus homogènes que les valeurs de K_m^C, surtout en tenant compte des erreurs expérimentales calculées (Figure 53). Les chimères H, J, K, M, N et O (28 à 33 min^{-1}) présentent des valeurs de k_2^C proches de celle du CYP2B6, alors que les chimères A, F et G (66 à 75 min^{-1}) sont proches du CYP2B11. Les chimères B (19 min^{-1}), C (2 min^{-1}) et E (23 min^{-1}) présentent des k_2^C inférieurs à ceux des deux parents. La chimère C présente un k_2^C respectivement 10 fois inférieur et 30 fois inférieur à celui du CYP2B6 et du CYP2B11, ainsi qu'un K_m^C très élevé, pouvant laisser penser que cette chimère est en fait pratiquement inactive.

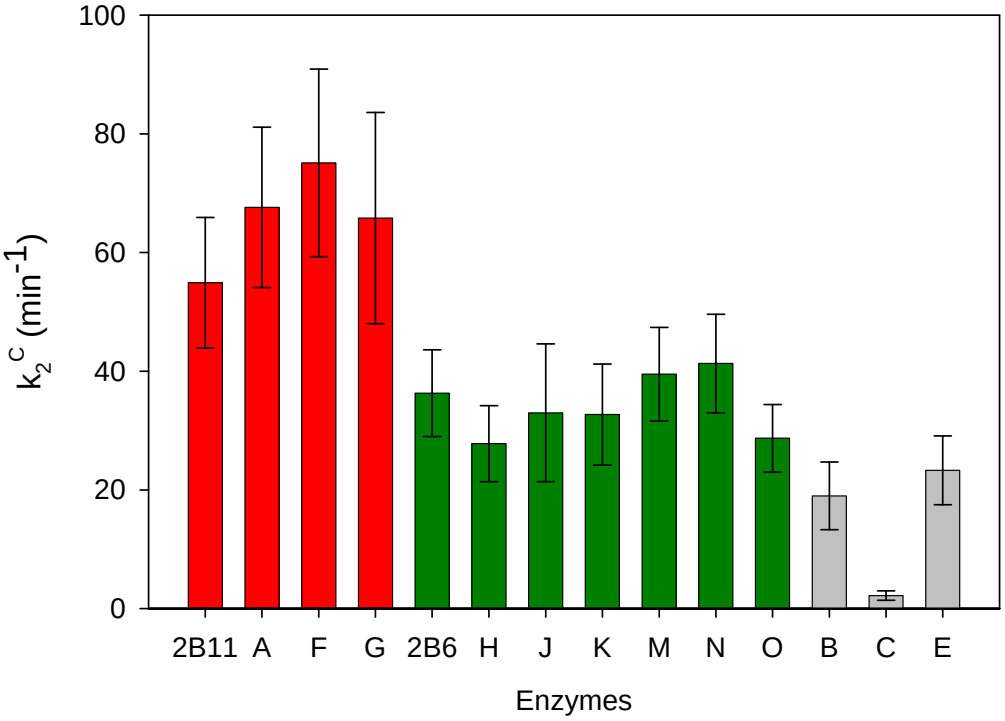


Figure 53 Valeurs de k_2^C des enzymes parentaux et des chimères. Les barres grises correspondent aux chimères présentant un k_2^C plus petit que celui des deux parents.

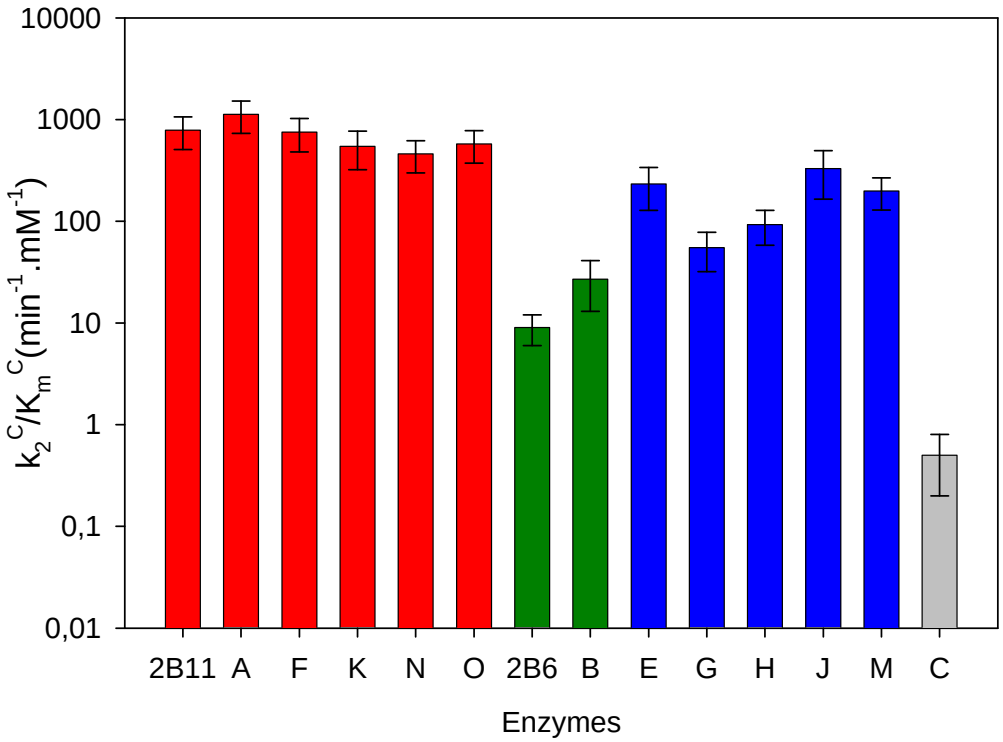


Figure 54. Valeurs du rapport k_2^C/K_m^C des enzymes parentaux et des chimères selon une échelle logarithmique. La barre grise correspond à la chimère présentant un k_2^C/K_m^C plus petit que celui des deux parents.

5.3.4.3. Efficacité catalytique pour l'activité CPA hydroxylase des enzymes : k_2^C/K_m^C

En ce qui concerne l'efficacité catalytique pour l'activité CPA hydroxylase des enzymes, les valeurs calculées sont relativement similaires à celles observées lors d'études précédentes (Chen, Lin et al. 2004 ; Nguyen, Tychopoulos et al. 2008)

Il est clair que c'est la baisse du K_m^C du CYP2B11 qui lui confère une efficacité très importante (k_2^C/K_m^C = 784 $min^{-1}.mM^{-1}$), presque 90 fois supérieure à celle du CYP2B6 (k_2^C/K_m^C = 9 $min^{-1}.mM^{-1}$) (Tableau 4 et Figure 54). La chimère J présente une valeur de k_2^C/K_m^C différente de celle des deux parents, mais malgré tout très proche de celle du CYP2B11, ses valeurs de k_2^C et de K_m^C étant non significativement différentes de celles du CYP2B11. Les chimères A, F, K, N et O montrent des valeurs de k_2^C/K_m^C proches de celle du CYP2B11 alors que la chimère B est plutôt proche du CYP2B6. Les chimères E, G, H et M présentent des valeurs intermédiaires, différentes de celles des deux parents (Figure 54).

L'augmentation de K_m^C et la baisse de k_2^C de la chimère C induisent une efficacité très faible, bien inférieure à celle du CYP2B6. Au vu de cette faible efficacité, il est possible que l'activité que nous ayons observée soit en fait due à des enzymes autres que la chimère, présents dans les microsomes préparés. En conséquence, la chimère C n'a pas été considérée dans la discussion sur les relations structure – fonction, ces caractéristiques étant incertaines.

5.3.4.4. Constante de Michaëlis des enzymes vis-à-vis de l'EFC : K_m^E

Pour la 7EFC, les deux enzymes parentaux possèdent des valeurs de K_m^E relativement proches (2B6 : 0,8 µM ; 2B11 : 1,2 µM). Les valeurs des chimères sont également relativement proches les unes des autres, sauf celle de la chimère B. Dans l'ensemble, les valeurs observées restent beaucoup plus rapprochées que les valeurs de K_m^C. En effet, les K_m^E des deux parents ne diffèrent que d'un facteur 1,5. Le K_m^E le plus faible (0,4 µM), observé pour les chimères G et O, et le K_m^E le plus élevé (4,6 µM), observé pour la chimère B, diffèrent d'un facteur 10. Pour le K_m^C, ces valeurs extrêmes diffèrent d'un facteur 60.

La réalisation d'un graphe représentant le K_m^C en fonction du K_m^E, les axes possédant une échelle logarithmique (Figure 55), nous permet d'observer la répartition des points en 3 groupes. Un premier groupe contient l'enzyme parental CYP2B11 et les chimères A, E, K et M. Un deuxième groupe, relativement proche du premier, contient les chimères B, F, H et O. Un troisième groupe, plus éloigné, contient le CYP2B6 et la chimère G.

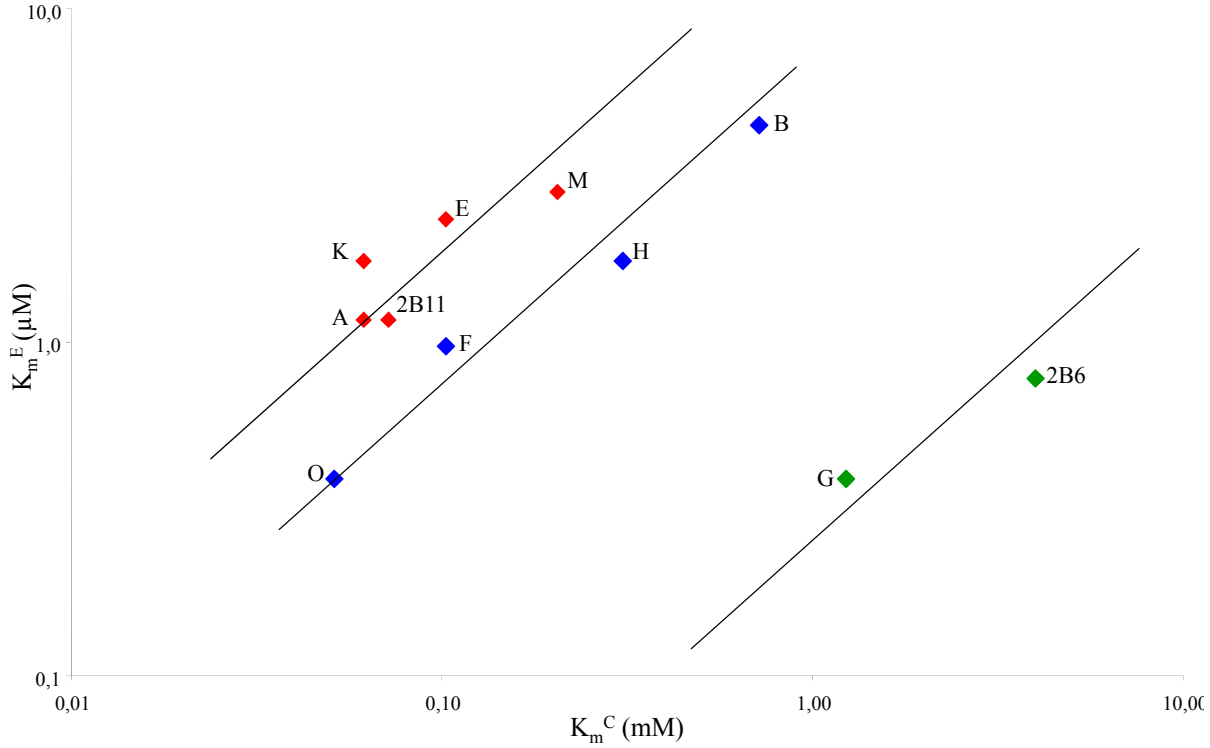


Figure 55. Comparaison log-log des affinités des CYP2B6, CYP2B11 et chimères vis-à-vis de deux substrats communs. Les noms des différents enzymes sont indiqués sur la figure. Les réactions étudiées sont l'hydroxylation de la cyclophosphamide (CPA) en abscisse et le deethylation de la 7 ethoxy trifluorocoumarine (7EFC) en ordonnée. Les échelles des deux axes sont logarithmiques.

5.3.4.5. Expression dans la levure (Tableau 4)

La mesure de la concentration en protéine totale et de la concentration en P450 des microsomes extraits des levures nous permet d'obtenir quelques informations sur l'expression des chimères dans cet organisme modèle. Il semblerait en effet que les chimères C, G, H, J, K et N soient faiblement exprimées dans la levure, les concentrations et contenus en P450 de ces chimères étant peu importants par rapport à ceux des enzymes sauvages. Ce sont également ces chimères qui présentent les valeurs d'erreur les plus importantes pour la mesure du spectre différentiel du P450. Ceci peut également amener à s'interroger sur la stabilité des enzymes lors des étapes d'extraction des microsomes et de test d'activité.

A l'inverse, les chimères B et O semblent être bien exprimées dans la levure, la concentration en P450 des microsomes contenant la chimère B étant même plus élevée que celles des enzymes sauvages. Les microsomes contenant la chimère O sont effectivement concentrés en P450 mais leur teneur spécifique en P450 est plus faible que celle des enzymes sauvages.

5.3.4.6. Perte de fonctionnalité

Enfin, il existe trois chimères inactives vis-à-vis des deux substrats utilisés : D, I et L. Or, même si la chimère I présente un nombre très important de substitutions par rapport aux autres chimères (Figure 49), ce n'est pas le cas des deux autres. La chimère D possède même le plus petit nombre de substitutions.

Les enzymes pour lesquels il n'a pas été possible de détecter une activité EFC deethylase, alors qu'ils sont actifs vis-à-vis de la CPA (chimères C, J et N), présentent une faible concentration des microsomes en P450 (Tableau 4).

5.4. Discussion

5.4.1. Canaux du CYP2B6

Toutes les structures présentées ont été réalisées avec le logiciel PyMol, sauf indication contraire.

Grâce au logiciel CAVER, plusieurs canaux communs à tous les P450s ont été modélisés et classés en différents types (1 à 5, S ou W) selon une nomenclature définie par Cojocaru et al. (Cojocaru, Winn et al. 2007). Une étude de dynamique moléculaire réalisée par Nguyen et coll.(Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) a permis de détecter trois voies d'entrée/de sortie principales (Figure 56).

Un premier groupe de canaux (orange/rouge sur la Figure 56) (correspondant au type 2) a été trouvé comme étant proche de l'hélice B', des deux côtés de la boucle B-C, une région connue comme étant très flexible, adoptant différentes conformations suivant la nature du substrat lié (Honma, Li et al. 2005). Le second canal (en bleu sur la Figure 56) (correspondant au type S) se situe entre les hélices E, F et I. Il présente, comme le premier groupe de canaux, une position flexible au cours de l'analyse dynamique, oscillant même entre un état largement ouvert et un état pratiquement fermé. Le dernier canal (en violet sur la Figure 56) (correspondant au type 5) est situé entre les hélices A, K' et K".

Ces canaux de type 2 (entrée) et S (sortie) sont fréquemment retrouvés dans les P450s. En effet, la région boucle B-C/hélice B', étant hautement variable en séquence entre les différents P450s, est importante pour la reconnaissance et la spécificité de substrat.
Le canal 5, est un canal particulier de rôle inconnu et retrouvé dans peu de structures de P450s. Les 3 types de canaux ont été retrouvés dans la structure ouverte du CYP2B4, indiquant des voies d'accès/de sortie similaires pour les deux P450s 2B4 et 2B6, malgré des différences au sein de leur site actif.

5.4.2. Topologie membranaire des CYPs 2B11 et 2B6

L'hydrophobicité des différents résidus du CYP2B4 et du CYP2C5 situés en surface des protéines (Williams, Cosme et al. 2000; Zhao and Halpert 2007), ainsi que la réalisation d'expériences d'accessibilité de résidus pour la fixation d'anticorps spécifiques (De Lemos-Chiarandini, Frey et al. 1987) ont permis de déterminer un modèle global d'interaction des CYPs microsomaux avec la membrane. Les nombreux essais de cristallisation des CYPs membranaires ont également identifiés des régions essentielles à l'attachement des CYPs à la membrane (Cosme and Johnson 2000). Ces régions ont été représentées sur les Figure 57 et Figure 58. Il a ainsi été postulé que la topologie du CYP2B4 microsomal plaçait l'embouchure d'un canal d'accès au site actif juste au-dessus du feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique. Les substrats hydrophobes, capables de traverser cette membrane, pourraient alors accéder au site actif par ce canal.

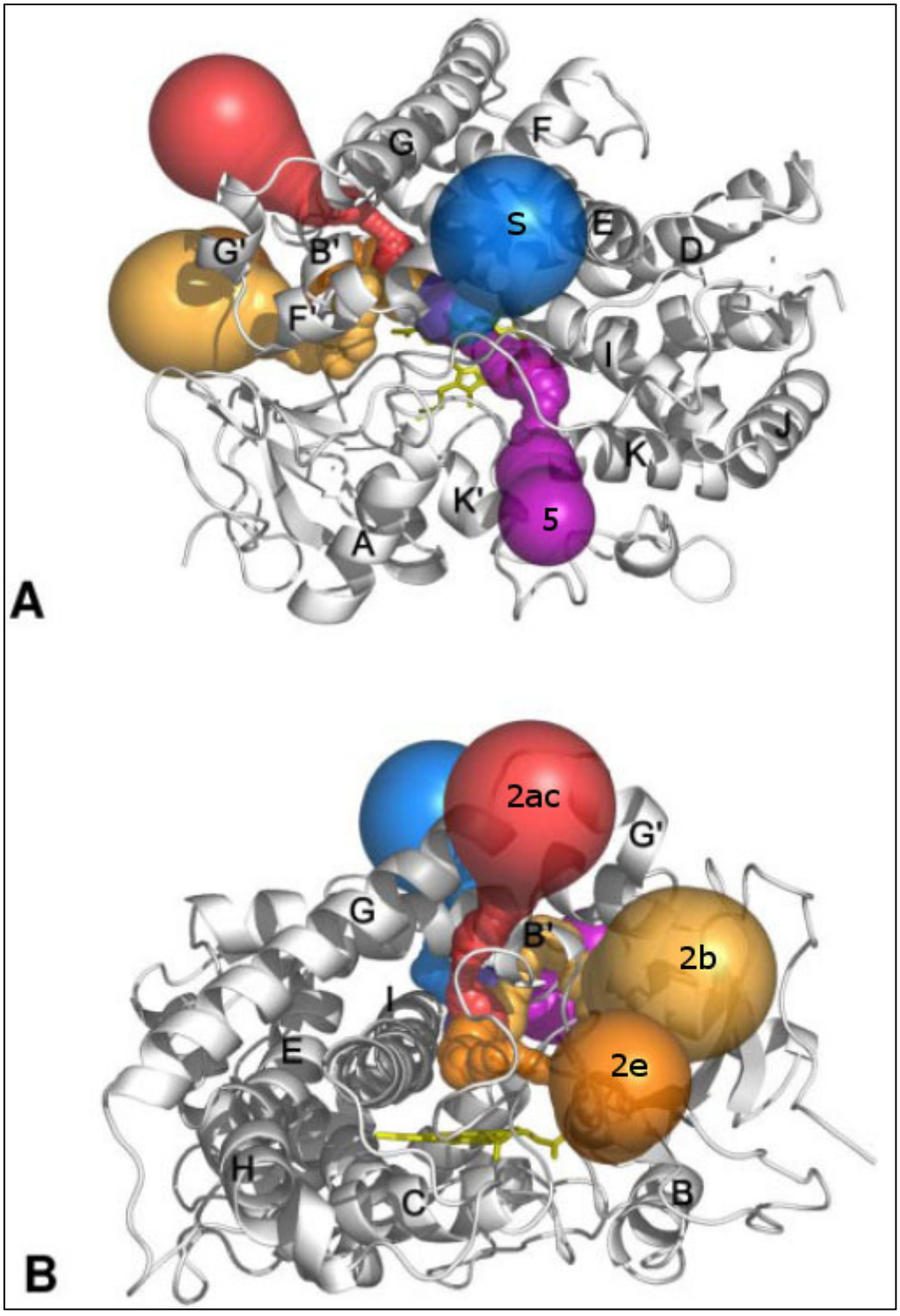


Figure 56. Topologie du CYP2B6 et de ses canaux de circulation du substrat. La protéine est représentée en gris. Les hélices α sont désignées par leurs lettres correspondantes. Les canaux sont indiqués et représentés en utilisant la représentation Van der Waals générée par CAVER dans un environnement PyMol. A: Vue du dessus de l'hème. B: Vue de côté le long de l'hélice I. Le CYP2B6 possède en fait 5 canaux de type 2 (2a, 2b, 2c, 2ac, 2e) qui présente une variabilité de position autour de l'hélice B', dépendante de la conformation de la boucle B-C lors de la dynamique moléculaire. Sur cette figure est représentée la configuration où le CYP2B6 présente les canaux 2ac, 2b et 2e (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).

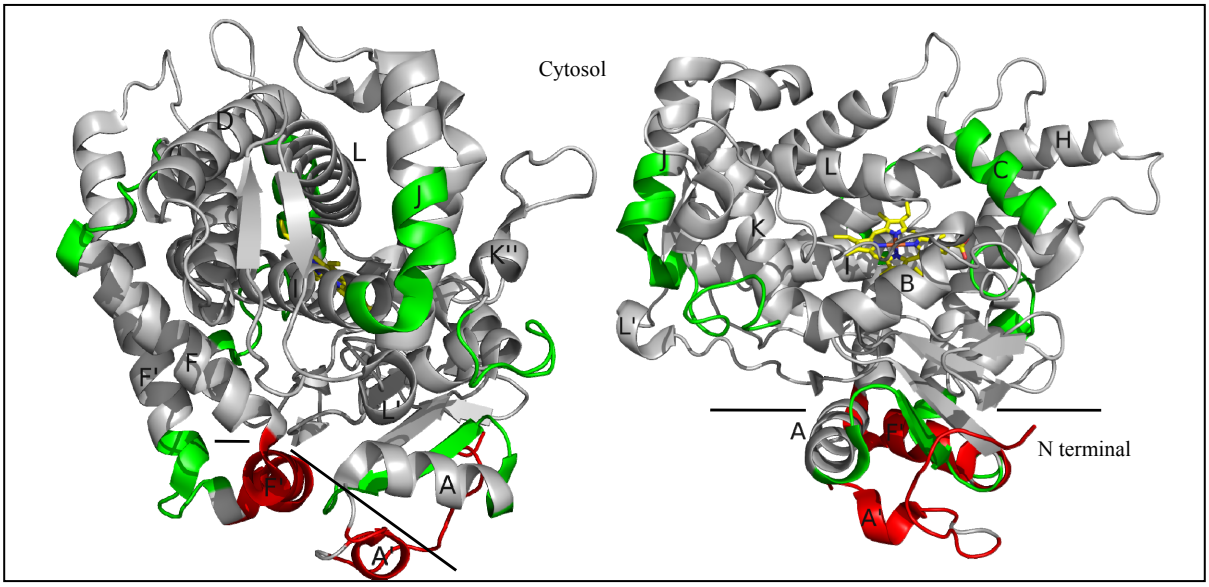


Figure 57. Représentation de la topologie du CYP2B4 par rapport à la membrane du réticulum endoplasmique, déduite de l'étude de DeLemos – Chiarandini (De Lemos-Chiarandini, Frey et al. 1987). La protéine, l'hème, les parties interagissant avec la membrane et les parties se trouvant en surface sont en gris, en jaune, en rouge et en vert, respectivement. Les principales hélices sont indiquées. Le trait représente très schématiquement la position de la membrane du réticulum endoplasmique, le côté cytosolique se trouvant au-dessus de cette ligne. Les figures de droite de gauche sont des vues distale et proximale du CYP2B4, respectivement.

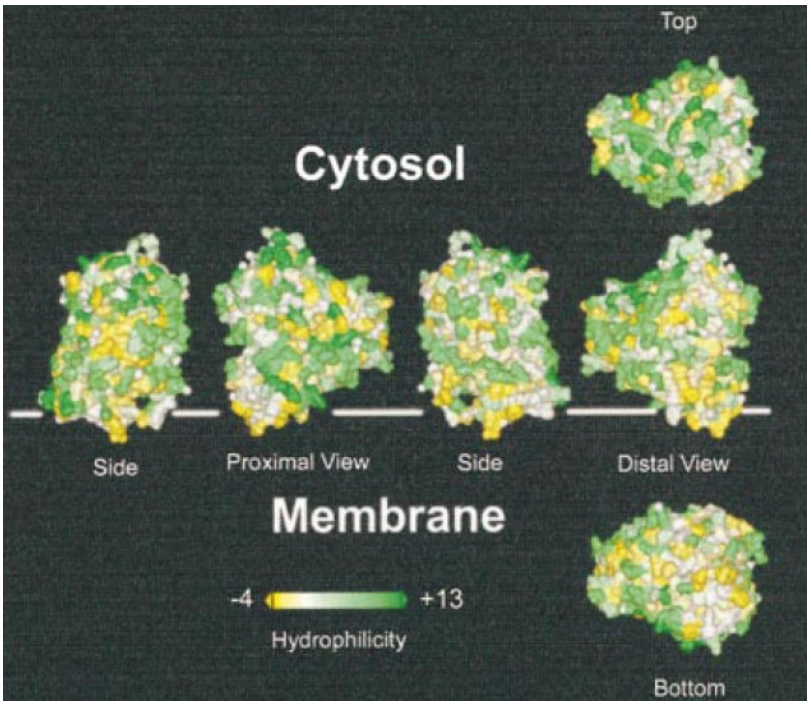


Figure 58. La surface de la structure cristalline du CYP2C5 représentée avec le logiciel INSIGHT II et coloré selon l'hydrophilicité des résidus selon l'échelle indiquée en bas de la figure. La ligne blanche représente la membrane du réticulum endoplasmique, la face cytosolique étant située sur le dessus de cette ligne (Williams, Cosme et al. 2000).

Les substrats hydrophobes, capables de traverser cette membrane, pourraient alors accéder au site actif par ce canal. Les métabolites hydroxylés ou d'autres substrats plus hydrophiles, quant à eux, sortiraient ou entreraient par d'autres canaux débouchant directement dans le cytoplasme.

5.4.3. Relations entre K_m et structure tridimensionnelle

Lorsque les considérations que nous avons émises sur l'affinité sont transposées au niveau de la structure de l'enzyme, une hypothèse peut être formulée. En effet, la deuxième étape de la réaction, caractérisée par la constante catalytique k_2, représente la formation du produit à partir du complexe ES. Lors de cette étape, le substrat se trouve alors déjà au niveau du site actif. *A priori*, la vitesse de cette étape est donc surtout dépendante, en plus des transferts électroniques, des acides aminés situés au niveau du site actif de l'enzyme et éventuellement au niveau du canal de sortie du métabolite.

Ceci semble être corroboré par les résultats observés pour les enzymes CYP2B11 et CYP2B6 vis-à-vis de la CPA. Dans ce cas, les sites actifs identifiés sont très semblables. En effet, l'unique résidu 114 qui diffère pour les deux enzymes est une valine dans le CYP2B11 et une isoleucine dans le CYP2B6 (Figure 59). Et de fait, les constantes catalytiques des deux parents et des chimères sont relativement proches les unes des autres.

Ceci pourrait alors laisser penser que les changements de K_m observés pour les chimères proviendraient majoritairement de changements concernant l'association et la dissociation du complexe ES. Ces changements pourraient alors être dus à la modification de la reconnaissance de la CPA par l'enzyme, ou des modifications de l'accessibilité de la CPA au site actif (Nakayama, Puchkaev et al. 2001). Ces processus dépendent généralement de résidus se trouvant en surface de la protéine, ou au niveau des parois de canaux d'accès. Ceci indiquerait une modulation possible du K_m par le changement de résidus situés à distance du site actif, ce qui est le cas pour les chimères CYP2B11/CYP2B6.

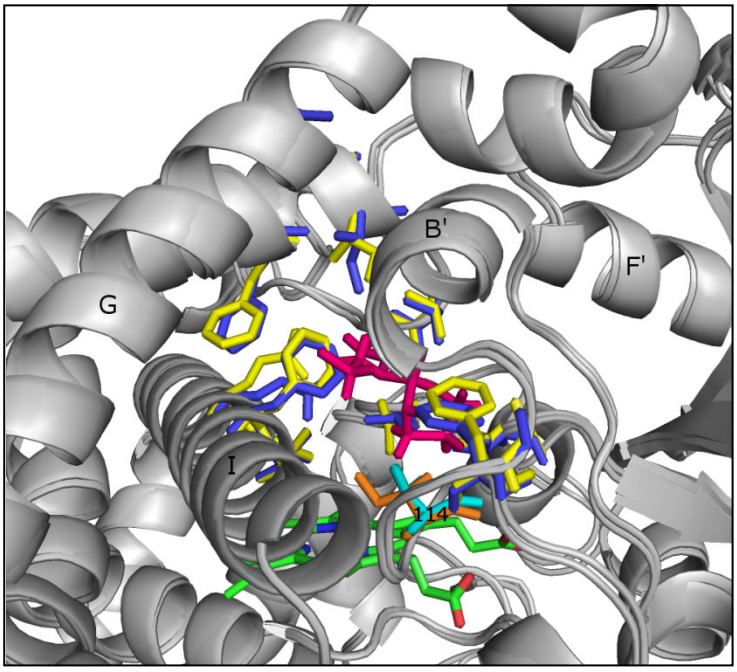


Figure 59. Vue le long de l'hélice I des CYPs 2B11 et 2B6. Les hélices principales sont notées. Les résidus représentés par des bâtonnets bleu et jaunes appartiennent respectivement au site actif du CYP2B11 et du CYP2B6. L'hème est représenté en vert, la CPA en rose. Les résidus valine 114 du CYP2B11 et leucine 114 du CYP2B6, numérotés, sont respectivement représentés en cyan et en orange.

5.4.4. Chimères présentant un K_m^C proche de celui du CYP2B11 : **A, E, F, J, K, N et O**

Dans les structures qui suivent, la protéine est représentée en gris et l'hème en bâtonnets verts. Les résidus d'intérêt sont numérotés et représentés, en bleu ou en jaune selon qu'ils appartiennent respectivement au CYP2B11 ou à la chimère étudiée.

*5.4.4.1. Chimères présentant une efficacité catalytique proche de celle du CYP2B11 : **A, F, J, K, N et O** (Figure 49)*

- Ces chimères présentent des K_m^C et k_2^C/K_m^C similaires à ceux du CYP2B11 pour la métabolisation de la CPA (Tableau 4 et Figure 54). En ce qui concerne le k_2^C, les chimères A et F montrent des valeurs similaires à celle du CYP2B11, alors que J, K, N et O montrent des valeurs similaires à celle du CYP2B6. Mais les valeurs de constantes catalytiques des deux parents étant proches, nous pouvons considérer que ces chimères possèdent une activité globale similaire à celle du CYP2B11.
- Les substitutions V204Q, S205T et A207S, comprises dans le fragment F, se trouvent au niveau du SRS-2 (Gotoh 1992) et d'un fragment identifié comme interagissant avec la membrane (Cosme and Johnson 2000). Malgré ces études sur l'influence de certains résidus dans l'activité des CYP2B, nos résultats semblent montrer que ces résidus, ainsi que les autre substitutions présentes dans les chimères A, F, J, K, N et O ne sont pas impliqués dans l'activité CPA hydroxylase des CYPs 2B11 et 2B6.

Nos résultats laissent à penser que les résidus substitués dans les chimères A, F, J, K, N et O ne semblent pas jouer de rôle prépondérant dans la différence d'activité des deux enzymes parentaux CYP2B11 et CYP2B6 vis-à-vis de la CPA.

*5.4.4.2. Chimère présentant un TN inférieur à celui du CYP2B11 : **E** (substitutions présentées en Figure 60)*

- Cette chimère présente une baisse de k_2^C par rapport au CYP2B11, alors que son K_m^C reste proche de celui de l'enzyme canin. Ceci induit donc une baisse de l'efficacité catalytique de cette chimère par rapport au CYP2B11 (Tableau 4). Le calcul d'une constante catalytique intermédiaire à celle des deux parents pour l'EFC, ainsi que la bonne expression de cette chimère, semblerait indiquer que la baisse de k_2 observée pour la CPA est bien spécifique à ce substrat.
- Etudes précédentes :
  - Le module E contient une partie de l'hélice D et de l'hélice E (Figure 61). La substitution en position 172 se trouve en fait au niveau de l'hélice E, qui fait partie de la paroi du canal S (ou solvant) (Cojocaru, Winn et al. 2007 ; Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) (Figure 56). Il a été postulé que ce canal servait à l'évacuation du métabolite après transformation du substrat, une amélioration de cette étape pouvant effectivement induire une augmentation de la constante catalytique.
  - La mutation inverse de celle effectuée dans notre cas en position 172 (Q172H) est une forme polymorphique du CYP2B6 relativement répandue (Lang, Klein et al. 2001). Toujours associée à d'autres mutations ponctuelles, il n'a pas été vraiment possible d'évaluer son effet réel sur le métabolisme de substrats spécifiques au CYP2B6, dont la CPA et la 7EFC, mais les formes contenant cette mutation présentent des modifications de métabolisme par rapport à l'enzyme sauvage (Chang, Weber et al. 1993 ; Jinno, Tanaka-Kagawa et al. 2003).
- En considérant les modèles structuraux de CYP2B11 et de la chimère E (Figure 61), nous formulons l'hypothèse que la substitution H172Q pourrait induire la rupture de l'éventuelle interaction entre des résidus aromatiques (empilement d'orbitales pi) de l'histidine 172 avec la tyrosine 203. Il est possible que dans le CYP2B11, cette interaction stabilise l'interaction entre les hélices E et F, stabilisant ainsi les parois du canal, et permettant une meilleure sortie du métabolite.

La position des autres résidus substitués, à la surface de la protéine et éloignés de la paroi du canal, semblerait indiquer qu'ils ne jouent pas un rôle prépondérant dans ce changement de k_2^C.

Les modèles structuraux, ainsi que le fait que ce résidu ait déjà été mentionné dans des études précédentes, ont conduit à poser l'hypothèse de l'implication du résidu 172, chargé positivement dans le CYP2B11 et neutre dans le CYP2B6, dans l'activité du CYP2B11 vis-à-vis de la CPA.

En conclusion, le résidu 172 de l'hélice E pourrait être impliqué dans la modulation du TN des CYPs 2B11 et de la chimère E vis-à-vis de la CPA, selon sa nature, mais sans affecter le K_m^C.

E	153	154						160	161		163		165					170		172		174										184
CYP2B11	L	V	E	E	L	R	K	T	E	G	V	L	Q	D	P	T	F	F	F	H	S	M	T	A	N	I	I	C	S	I	V	F
CYP2B6	.	I	.	.	.	.	.	S	K	.	A	.	M	.	.	.	.	L	.	Q	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figure 60. Substitutions d'acides aminés résultant de l'échange du module structural E (associé à la Figure 61)

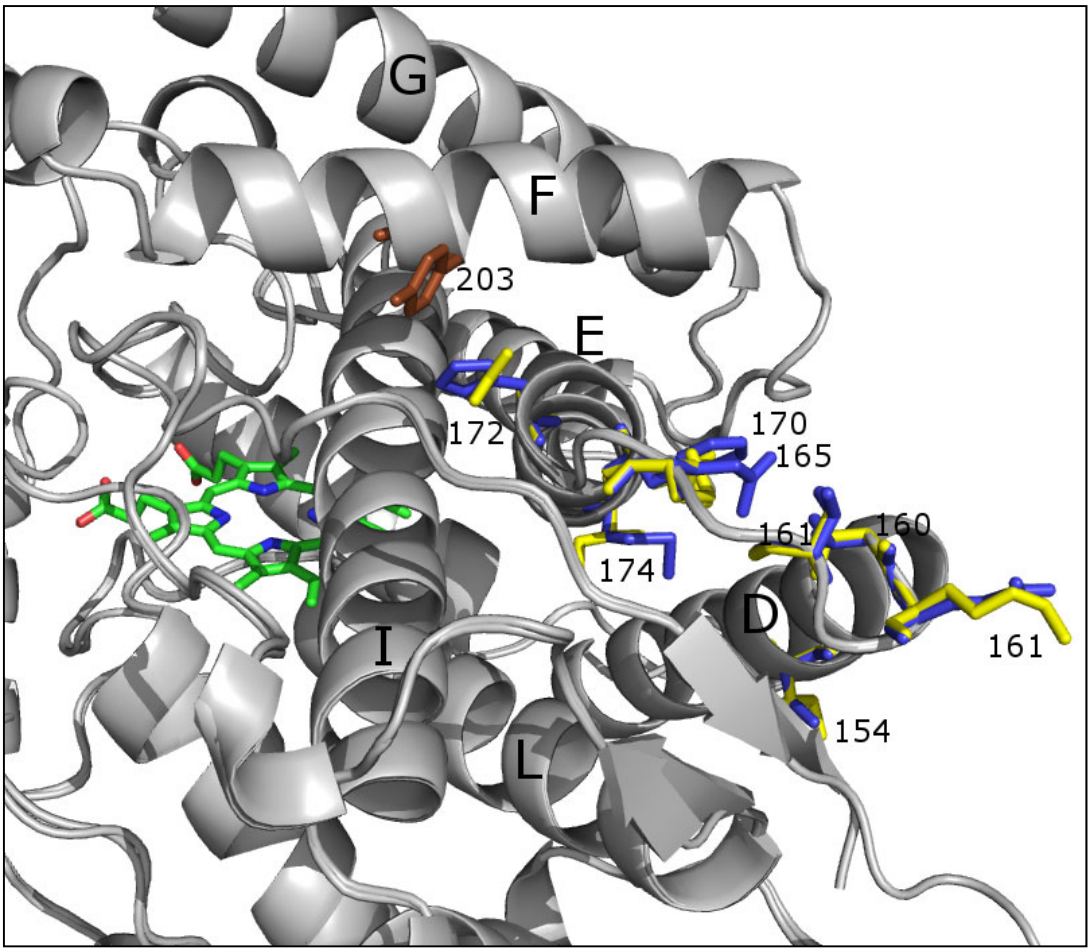


Figure 61. Vue de côté le long de l'hélice E du CYP2B11 et de la chimère E. Le résidu 203 est indiqué en bâtonnets marron.

5.4.5. Chimères présentant un K_m^C intermédiaire : **B, H, M et G**

5.4.5.1. Chimère B (substitutions présentées en Figure 62)

- Cette chimère présente le troisième K_m^C le plus élevé pour la CPA (Figure 52 et Tableau 4), ainsi qu'un TN diminué. Au final, la chimère B présente donc une efficacité proche de celle du CYP2B6.
- Le module B contient les hélices A et A', comprenant le résidu substitué 43. Or, il a été déduit que les résidus 30 à 45, consécutifs au segment transmembranaire du P450 et agissant comme une charnière entre ce segment et la partie cytosolique de la protéine, feraient partie d'une zone interagissant avec le feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (De Lemos-Chiarandini, Frey et al. 1987 ; Williams, Cosme et al. 2000) (Figure 57). Le résidu 43 est proche de la phénylalanine 220 de l'hélice F' (Figure 65). Or il est connu que l'hélice F' possède un rôle important dans la métabolisation des substrats par les CYP2B, notamment dans la formation d'un site actif adéquat pour les différents substrats transformés par les CYP2B (Scott, He et al. 2003 ; Scott, White et al. 2004 ; Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).
- Les études réalisées précédemment indiquent que les résidus phénylalanine ont tendance à pénétrer profondément dans le cœur hydrophobe des bicouches lipidiques (Zhao, White et al. 2006). La substitution F43L pourrait donc induire une déstabilisation de la chimère par rapport au CYP2B11. Dans le modèle structural de la chimère B, il a été observé que cette substitution pourrait détruire l'empilement d'orbitales pi existant entre les F43 et F220 de l'hélice F' du CYP2B11 (Figure 65), détruisant ainsi un moyen de fermeture du site actif et diminuant l'hydrophobicité du site favorable à la métabolisation de la CPA (Bathelt, Schmid et al. 2002). En considérant les informations disponibles, il semblerait plausible que cette substitution puisse expliquer la diminution du k_2^C observé pour la chimère.

Pour notre part, d'autres substitutions nous semblent intéressantes. Dans la chimère B, le résidu en position 59 est une arginine, située en fait non loin de l'embouchure du canal 5 (Figure 56), et pouvant éventuellement se lier par pont salin à l'acide aspartique en position 64 (Figure 63), lui aussi dans le fragment B. Dans le modèle du CYP2B11, le résidu 59 est une glutamine, pouvant établir une liaison hydrogène avec la sérine 394, appartenant à l'hélice K' (Figure 63). Cette liaison dans le CYP2B11 permettrait d'éloigner l'hélice K' de l'hélice K, maintenant ainsi une ouverture du canal 5, ce qui pourrait augmenter la diffusion du substrat. La substitution S59R induirait la rupture de cette liaison et pourrait expliquer pourquoi le K_m^C de la chimère B augmente.

Dans cette chimère, la substitution L58F pourrait induire la formation d'un empilement d'orbitales pi entre la F58, située dans l'hélice A, et la F65 du feuillet β 1-1 (Figure 64), ce qui pourrait permettre une rigidification de la structure secondaire de cette région, diminuant l'accès du substrat au site actif dans la chimère par le canal 5. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer l'augmentation de la valeur du K_m^C de la chimère B par rapport au CYP2B11.

		35				39				43							49									58	59						65
B	2B11	R	P	L	P	I	L	G	N	F	L	Q	M	D	R	K	G	L	L	K	S	F	L	R	L	Q	E	K	Y	G	D	V
	2B6	.	.	.	.	L	.	.	.	L	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	F	R	.	.	.	.	.	.

Figure 62. Substitutions d'acides aminés résultant de l'échange du module structural B (associé aux Figure 63,Figure 64Figure 65)

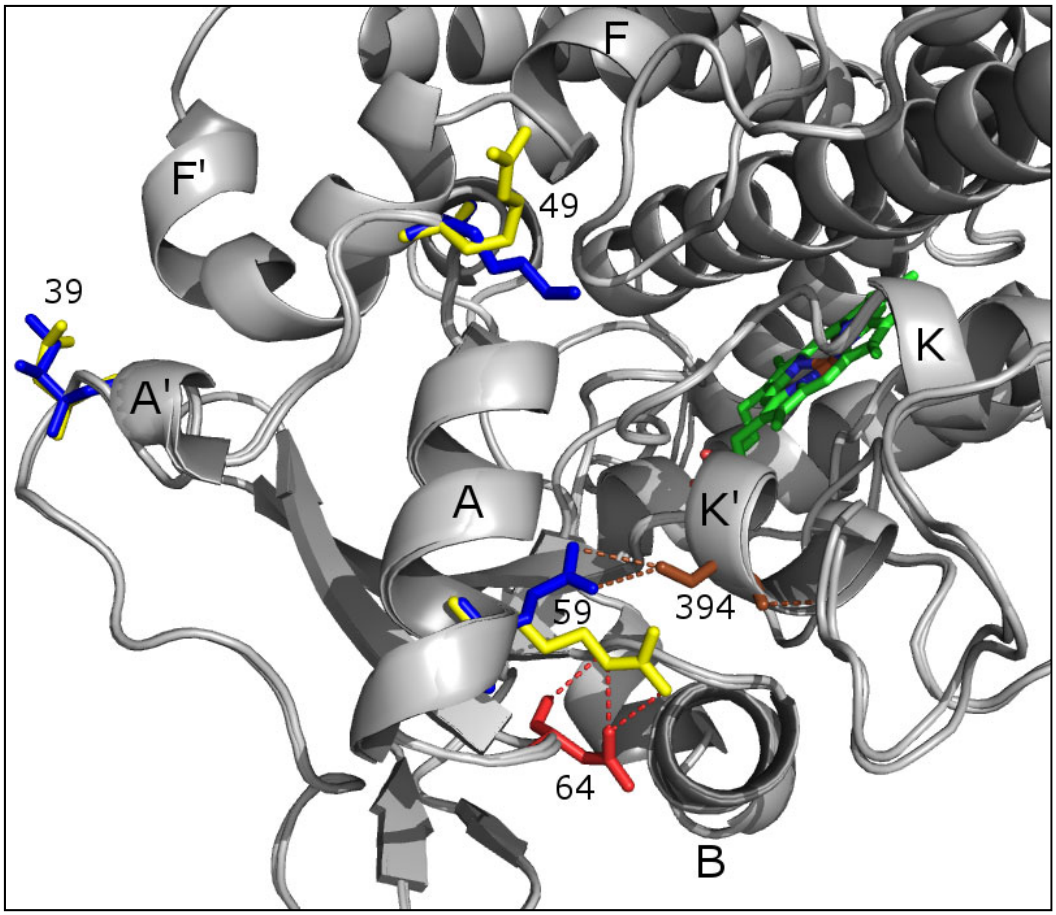


Figure 63 Vue de côté le long de l'hélice A du CYP2B11 et de la chimère B. Les résidus sérine 394 et acide aspartique 64 sont numérotés et représentés respectivement en bâtonnets marron et rouge, respectivement. Les liaisons ioniques et hydrogènes que ces résidus sont capables d'établir sont indiquées en pointillés de la couleur correspondante.

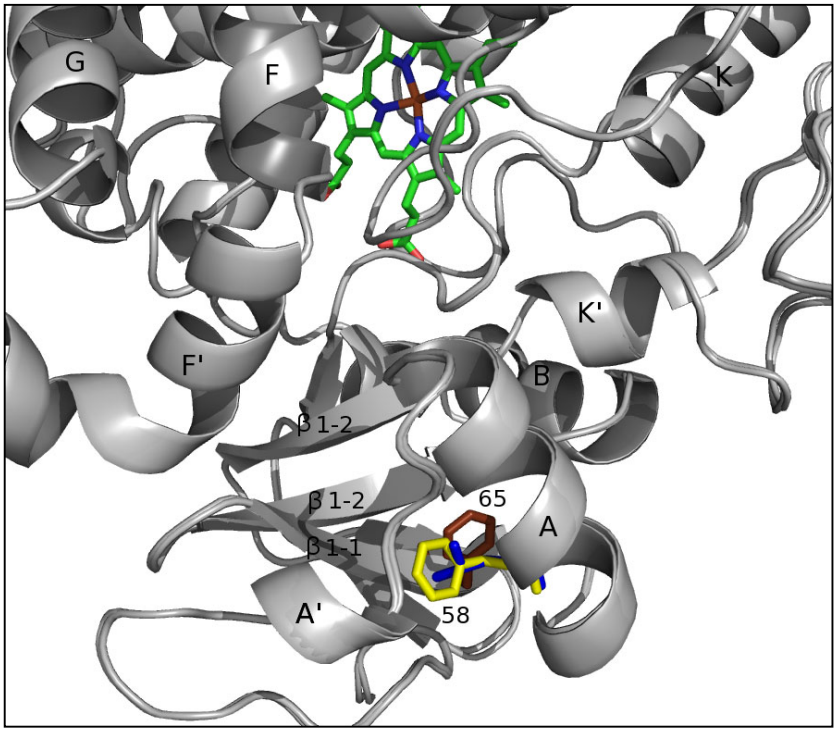


Figure 64. Vue de côté du CYP2B11 et de la chimère B. Le résidu phénylalanine 65 est numéroté et représenté en bâtonnets marron.

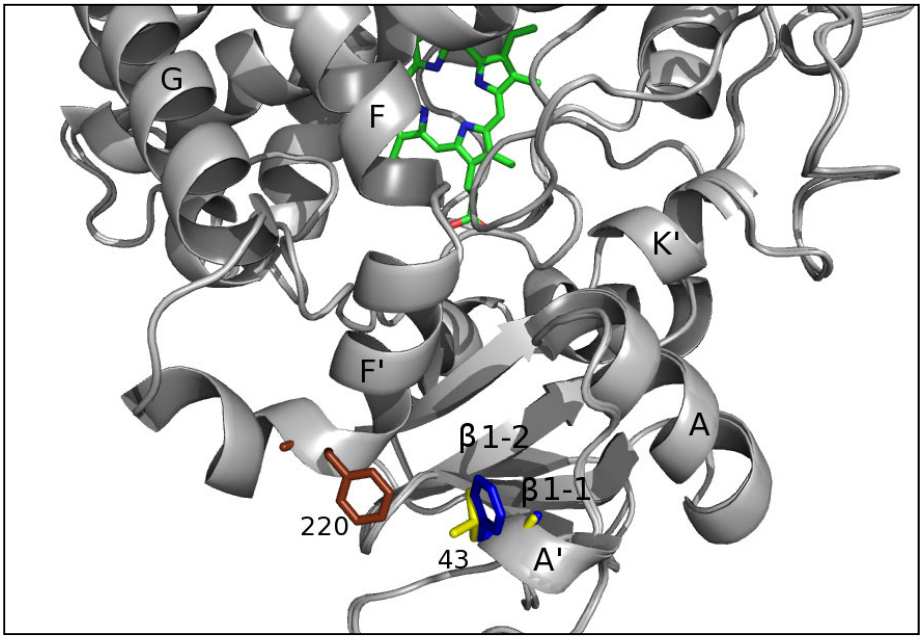


Figure 65. Vue de côté du CYP2B11 et de la chimère B. Le résidu phénylalanine 220 est numéroté et représenté en bâtonnets marron.

En observant les modèles du CYP2B11 et de la chimère B, les substitutions aux positions 39 et 49, n'induisant pas de changement stérique ou électrostatique majeurs, sembleraient ne pas jouer de rôle dans les changements observés.

En considérant les différentes hypothèses, les modèles structuraux et les études précédemment réalisées, nous formulons l'hypothèse que la substitution F43L puisse participer à la baisse du TN de la chimère B par rapport au CYP2B11. De même, les substitutions Q59R, et secondairement L58F, pourraient jouer un rôle dans l'augmentation du K_m^C de l'activité CPA hydroxylase de la chimère B par rapport au CYP2B11.

5.4.5.2. Chimère H (substitutions présentées en Figure 66)

- Cette chimère présente un K_m^C de valeur intermédiaire et une constante k_2^C similaire à celle du CYP2B6, induisant un rapport k_2^C/K_m^C de valeur intermédiaire à celui des deux parents (Figure 54 et Tableau 4).
- Etudes précédentes :
  - Le fragment H comprend l'hélice G en totalité, identifiée comme interagissant en partie avec la membrane (Zhao, White et al. 2006) (Figure 57). Ce fragment comprend également le SRS3 (Gotoh 1992) où une seule substitution, N236K, est présente. Or la substitution inverse, K236N, a déjà été effectué dans le CYP2B6 et avait entraîné une augmentation du K_m^C du mutant pour la CPA (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008). Il avait été déduit que la disparition de la charge positive au niveau du résidu 236 avait entraîné une différence d'interaction avec le feuillet externe de la membrane du RE et ainsi un mouvement modifié de la couronne F/G/boucle F-G, changeant l'affinité de l'enzyme mutée.
  - La substitution M248S est située au niveau de la région de l'hélice G proche de l'hélice E (Figure 67). Il a déjà été remarqué que dans le CYP2B11 (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008), la méthionine est capable d'interagir avec la phénylalanine 184 juste en face par des interactions hydrophobes (Tatko and Waters 2004), pouvant entraîner une rigidification de la structure E-F. Ceci stabiliserait la protéine dans la membrane et permettrait ainsi un meilleur accès de la CPA hydrophobe, arrivant de la membrane, vers le site actif.
- Les constantes enzymatiques et le modèle structural observés pour la chimère H semblent indiquer que nos résultats rejoignent ceux de Nguyen et al (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) sur le fait que la nature, neutre ou chargée, du résidu 236 semble importante pour l'activité des CYP2B6 et 2B11 vis-à-vis de la CPA. En effet, la substitution N236K de la chimère, changeant les propriétés électrostatiques, induit une baisse d'activité générale. De la même manière, la rupture de l'interaction de la M248 avec la F184 dans la chimère H (substitution de la méthionine par une sérine) pourrait entraîner l'augmentation du K_m^C en diminuant la rigidification de la structure E-F, ce qui va dans le sens de l'effet déstabilisateur présupposé (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).

		226				230						236						242		244		246	247	248							256
H	**2B11**	Y	F	P	G	T	H	R	Q	V	Y	N	N	L	Q	E	I	K	A	F	I	A	R	M	V	E	K	H	R	E	T	L
	2B6	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	N	.	Y	.	G	H	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figure 66. Substitutions de résidus résultant de l'échange du module structural H (associé à la Figure 67)

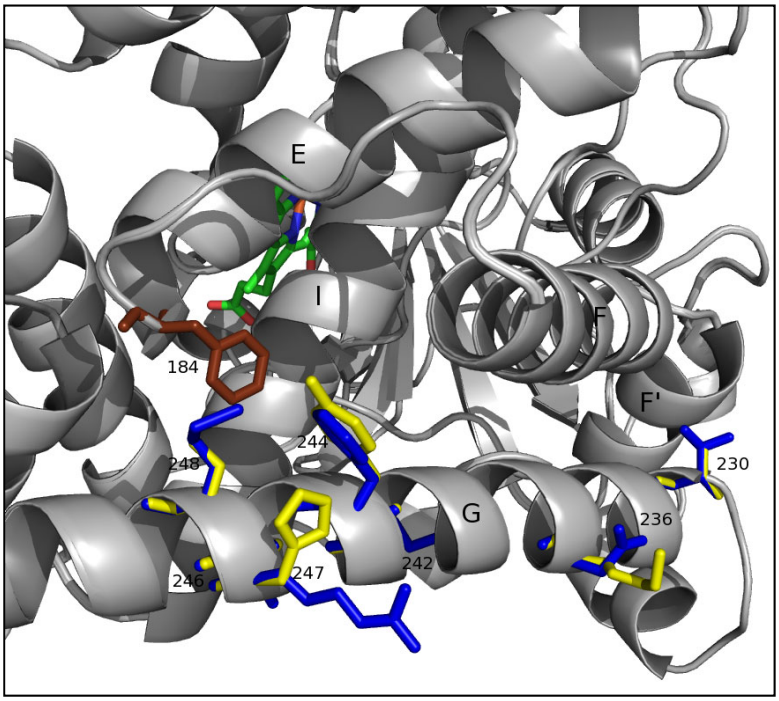
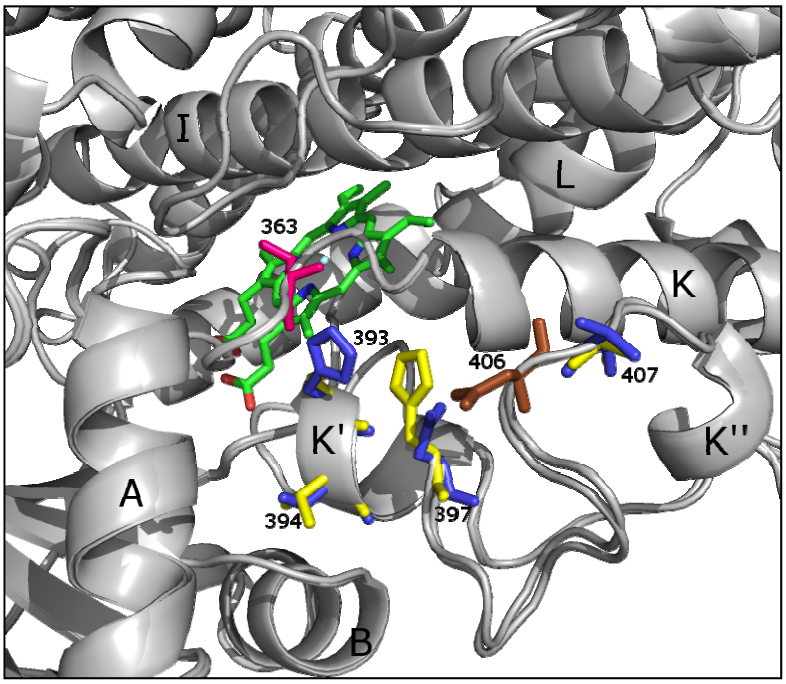


Figure 67. Vue de côté du CYP2B11 et de la chimère H. Le résidu phénylalanine 184 est numéroté et représenté en bâtonnets marron.

		392	393	394			397									407											419
M	**CYP2B11**	L	H	S	A	L	N	D	P	H	Y	F	E	K	P	D	V	F	N	P	D	H	F	L	D	A	N	G	A
	CYP2B6	.	S	T	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figure 68. Substitutions de résidus résultant de l'échange du module structural M (associé à la Figure 69)

Figure 69. Vue de côté du CYP2B11 et de la chimère M. Les résidus leucine 363 et aspartate 406 sont numérotés et représenté en bâtonnets roses et marron, respectivement.



- La position des substitutions K242N et T230A (Figure 67) (non mentionnées dans d'autres études), pourtant hors du SRS mais remplaçant la charge et la polarité des acides aminés du CYP2B11, montrent qu'elles pourraient induire un changement d'interaction de l'hélice G du CYP2B11 avec la membrane, diminuant la diffusion du substrat.

Les autres substitutions ne semblent pas présenter d'interactions avec la membrane ou d'autres résidus, laissant supposer l'absence d'influence sur les changements d'activité de la chimère H pour la CPA, par rapport au CYP2B11.

Sur la base des modèles structuraux, nos résultats sont consistants avec la littérature sur l'importance du SRS-3 et de la nature des résidus 236 et 248 pour la bonne activité du CYP2B11 par rapport à la chimère H vis-à-vis de la CPA. De plus, nous posons l'hypothèse d'une éventuelle implication des résidus 230 et 236 dans cette même activité.

5.4.5.3. Chimère M (substitutions présentées en Figure 68)

- Cette chimère présente une augmentation d'un facteur 3 du K_m^C de la chimère par rapport au CYP2B11, et une valeur de k_2^C similaire à celle du CYP2B6, induisant un rapport k_2^C/K_m^C intermédiaire entre les deux enzymes parentaux (Figure 54 et Tableau 4).
- Etudes précédentes :
  - Les résidus substitués 393, 394 et 397 sont situés dans l'hélice K', qui se trouve au niveau de l'embouchure du canal 5 détecté dans le CYP2B6 (Figure 56) (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).
  - Le résidu 393 est situé à proximité de la leucine 363, qui est elle-même située dans le SRS-5. Or il a été déterminé que le résidu 363 joue un rôle important dans l'activité et la spécificité de substrat du CYP2B6, et même d'autres CYPs de la famille 2B (Szklarz, He et al. 1996 ; Domanski, Schultz et al. 1999 ; Domanski and Halpert 2001). Il a également été postulé que cette leucine se trouvait au niveau du site actif du CYP2B6 (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).

Dans la structure de la chimère M, l'histidine 397 est proche de l'aspartate 406 avec lequel elle pourrait établir un pont salin (Figure 69). Cette interaction localiserait alors ces deux résidus au niveau de l'entrée du canal 5, ce qui pourrait compliquer l'accès du substrat au site actif, comme pour la chimère B. Ainsi, réduire l'accessibilité du substrat au niveau du canal 5 pourrait augmenter le K_m^C de la chimère M vis-à-vis de la CPA.

		210		212	213	214		216					221	222			225
G	**2B11**	S	S	F	S	S	Q	M	F	E	L	F	H	S	F	L	K
	2B6	.	.	V	F	G	.	L	.	.	.	.	S	G	.	.	.

Figure 70. Substitutions d'acides aminés résultant de l'échange du module structural G (associé aux Figure 71 etFigure 72)

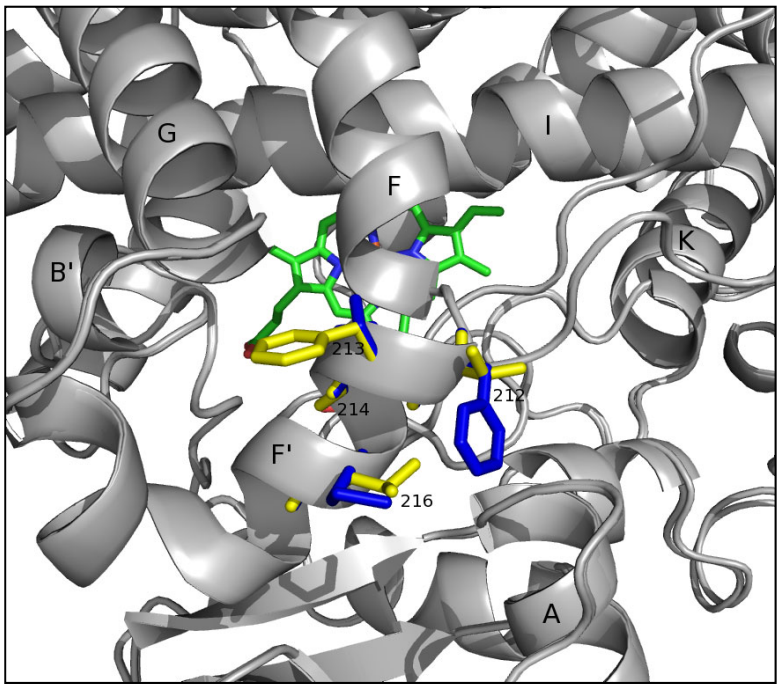
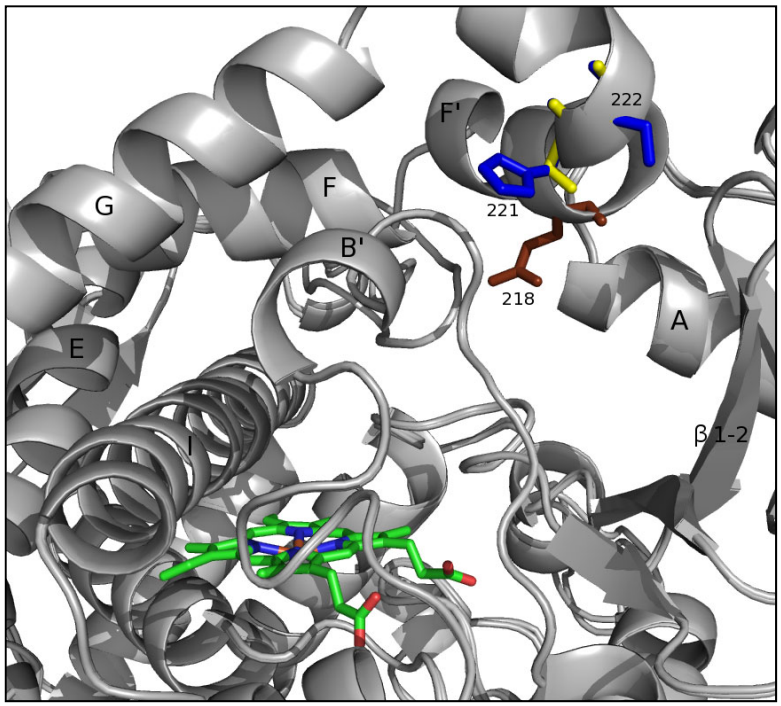


Figure 71. Vue de dessus de la face distale du CYP2B11 et de la chimère G.

Figure 72. Vue de côté, le long de l'hélice du CYP2B11 et de la chimère G. Le résidu glutamate 218 est numéroté et représenté en bâtonnets marron.



Il serait également possible que la charge positive de l'histidine 393, présente seulement dans le CYP2B11, influe sur la position de la leucine 363 incluse dans le site actif, permettant d'obtenir un meilleur TN vis-à-vis de la CPA.

Quant aux substitutions en position 394 et 407, n'induisant pas de modifications importantes au niveau de la taille ou de la nature électrostatique des résidus concernés, il semble peu plausible qu'elles jouent un rôle dans la modification des constantes enzymatiques de la chimère M par rapport au CYP2B11, pour l'activité CPA hydroxylase.

Les résultats issus de l'étude des structures des chimères B et M suggèrent l'implication du canal 5 pour l'activité CPA hydroxylase du CYP2B11.

5.4.5.4. Chimère G (substitutions présentées en Figure 70)

- Présente un K_m^C intermédiaire mais s'approchant le plus, après la chimère C, du CYP2B6 (Tableau 4 et Figure 52). Le TN est par contre similaire à celui du CYP2B11. Au final, le rapport k_2^C/K_m^C possède une valeur intermédiaire à celui des deux parents.
- Etudes précédentes :
    - Les substitutions F212V, S213F et S214G sont incluses dans le SRS2 et sont localisées au niveau de l'hélice F', entre les hélices F et G. Cette structure présente une certaine flexibilité lors de la fixation d'un ligand dans le site actif des CYPs 2B (Zhao and Halpert 2007) et a été identifiée comme une des régions interagissant avec la membrane du réticulum endoplasmique (De Lemos-Chiarandini, Frey et al. 1987) (Figure 57), l'hélice F' étant même modélisée comme pouvant être totalement incluse dans la membrane (Zhao, White et al. 2006).
    - La substitution H221S est intéressante car cette position a été identifiée comme critique dans la métabolisation de certains substrats pour le CYP2B4 et le CYP2B5 (Domanski and Halpert 2001), malgré le fait que ce résidu ne soit ni au niveau du site actif, ni en contact avec le substrat, ni dans un SRS
- Dans les modèles structuraux construits pour la chimère G et le CYP2B11, le résidu 221 se trouve à proximité du glutamate 218 (Figure 72). Sachant que l'hélice F' interagit fortement avec le feuillet externe de la membrane du RE, il semble peu probable que dans le CYP2B11, les résidus acide E218 et basique H221 soient chargés dans cet environnement très hydrophobe, et donc enclins à former un pont salin. Mais il a été observé qu'il pouvait exister de fortes interactions entre des résidus acides et basiques même non chargés (Zhou, Merianos et al. 2001). La rupture de cette interaction par la substitution H221S pourrait alors induire un changement de conformation, et ainsi d'ancrage, de l'hélice F' dans le feuillet externe de la membrane. La modification de cette stabilité pourrait alors expliquer en partie l'augmentation du K_m^C de la chimère G.

		124					129	130																				152
D	**2B11**	L	R	R	F	S	L	A	T	M	R	D	F	G	M	G	K	R	S	V	E	E	R	I	Q	E	E	A	Q	C
	2B6	.	.	.	.	.	V	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figure 73. Substitutions de résidus résultant de l'échange du module structural D (associé à la Figure 74)

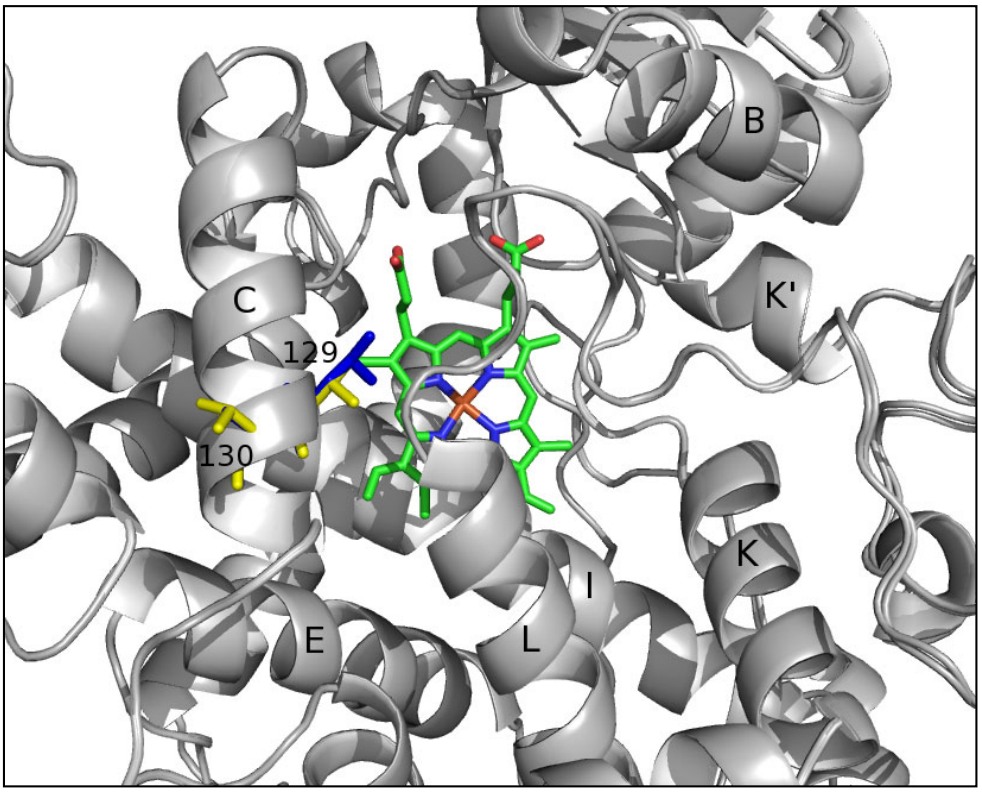


Figure 74. Vue de la face proximale du CYP2B11 et de la chimère D.

De la même manière, la substitution F212V (Figure 71) élimine un résidu phénylalanine capable de s'insérer profondément dans la partie hydrophobe d'un des feuillets de la membrane du RE, ce qui pourrait contribuer à diminuer l'ancrage de l'hélice F' dans la membrane (Zhao and Halpert 2007).

Quant à la substitution S213F (Figure 71), elle place à l'embouchure du canal 2b un résidu de taille importante, pouvant induire une moins bonne diffusion de la CPA par ce canal.

Le fait que les substitutions restantes conservent la taille des chaînes latérales des résidus, et malgré le fait qu'en position 214 et 222, un acide aminé polaire est remplacé par un résidu neutre, nous posons l'hypothèse que ces résidus ne possèdent pas d'influence sur la modification du K_m^C de la chimère G pour la CPA.

Le SRS-2 et la région de l'hélice F', notamment les résidus 212, 213 et 221, semble jouer un rôle important dans l'activité des CYP2Bs envers la CPA, allant ainsi dans le sens des études déjà réalisées. La chimère G, substituée au niveau de ces trois positions, possède en effet un K_m^C 20 fois plus élevé que celui du CYP2B11.

5.4.6. Chimères inactives : **D, I et L**

5.4.6.1. Chimère D (substitutions présentées en Figure 73)

- Il n'a pas été possible de mesurer une activité pour cette chimère, envers la CPA ou l'EFC, dans le cadre de notre protocole
- Les deux seules substitutions, L129V et A130T, sont situées sur la face proximale de la protéine, au niveau de l'hélice C, au cœur de la région reconnue comme interagissant avec la réductase (Scott, White et al. 2004) (Figure 74). Les résidus arginine 125, 126 et 133 et la lysine 139, chargées positivement, seraient en effet en partie responsables de l'accrochage électrostatique des CYP2B6 et 2B11 avec la P450 réductase, chargée négativement.
- La chimère D présente un changement de polarité, *via* la substitution A130T, au niveau de l'hélice C. Le fait que la chimère D soit inactive montrerait que les résultats semblent rejoindre les observations de Scott et al (Scott, White et al. 2004) sur le fait que cette zone des CYP2Bs pourrait interagir avec la P450 réductase.

D'après les structures étudiées et la littérature, la mutation du résidu 130, neutre, en un résidu polaire pourrait induire un dysfonctionnement au niveau du transfert d'électrons à la chimère D. Ceci pourrait expliquer l'inactivité de la chimère I envers la CPA et l'EFC, par rapport au CYP2B11.

Figure 75. Substitutions de résidus résultant de l'échange du module structural I (associé à la Figure 76)

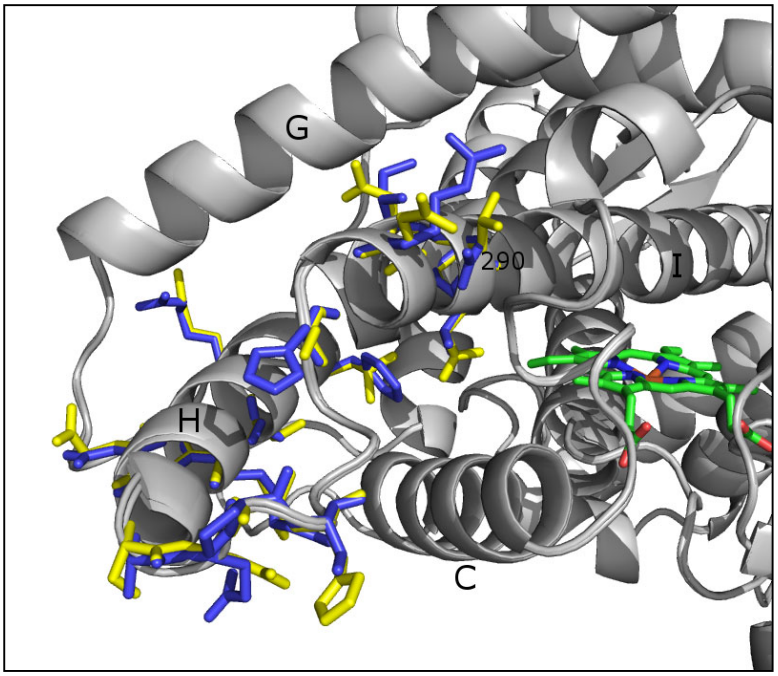


Figure 76. Vue de côté du CYP2B11 et de la chimère I. Le résidu phénylalanine 108 est numéroté et représenté en bâtonnets rouges et les résidus valine 114 et phénylalanine 115 en bâtonnets marron.

Figure 77. Substitutions de résidus résultant de l'échange du module structural L (associé à la Figure 78)

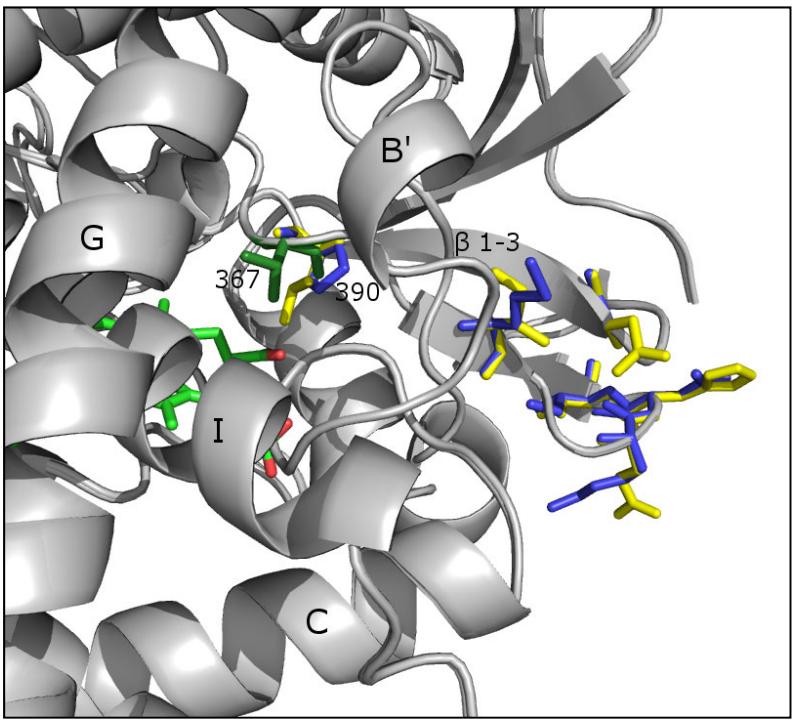


Figure 78. Vue de dessus de la face distale du CYP2B11 et de la chimère L. Le résidu valine 367 est numéroté et représenté en vert.

5.4.6.2. Chimère I (substitutions présentées en Figure 75)

- Il n'a pas été possible de mesurer une activité de cette chimère, envers la CPA ou l'EFC, dans le cadre de notre protocole. Le module I contient l'hélice H en totalité ainsi que la partie N terminale de l'hélice I et comporte de nombreuses substitutions (Figure 76).

- Une seule étude a mis en évidence l'importance de la présence d'un résidu chargé négativement au niveau du résidu 290 du CYP2B11, le remplacement de ce résidu par une valine induisant une réduction d'activité drastique vis-à-vis de l'androstènedione (Harlow and Halpert 1996).
- Dans la chimère I, la leucine neutre en position 290 remplace l'aspartate chargé négativement dans le CYP2B11 (Figure 76). L'influence du résidu 290 sur l'activité du CYP2B11 envers un autre substrat ayant déjà été identifiée, il semblerait que ce résidu, au moins en partie, serait impliqué dans l'inactivité de la chimère I.

La position des autres substitutions, en surface et éloignées de toute embouchure de canal (Figure 76), semble indiquer que ces résidus ne jouent pas un rôle très important dans la métabolisation de la CPA pour la chimère I par rapport au CYP2B11.

L'inactivité envers la CPA et l'EFC associée à la présence d'un résidu neutre en position 290 dans la chimère I, au lieu d'un résidu chargé négativement dans le CYP2B11, semble aller dans le sens de la littérature.

5.4.6.3. Chimère L (substitutions présentées en Figure 77)

- Il n'a pas été possible de mesurer une activité de cette chimère, envers la CPA ou l'EFC, dans le cadre de notre protocole.
- La substitution P390L se trouve à proximité de l'hème (Figure 78), et également d'un résidu placé *a priori* au niveau du site actif, la valine 367 (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008).
- La proline induisant des changements de conformation des structures secondaires et étant de taille plus importante que la leucine, il est possible que la substitution P390L induise une modification de la conformation du site actif, néfaste pour la métabolisation correcte de la CPA par la chimère I.

La position des autres substitutions, en surface et éloignées de toute embouchure de canal (Figure 78), semble indiquer que ces résidus ne jouent pas un rôle très important dans la métabolisation de la CPA pour la chimère L par rapport au CYP2B11.

Sur la base des structures du CYP2B11 et de la chimère I, nous proposons que la proline 390 puisse être importante pour la fonctionnalité du CYP2B11, vis-à-vis de la CPA et de l'EFC.

5.4.7. Analyse globale des chimères

L'identification pour chaque segment des acides aminés pouvant être responsables de la différence d'affinité du CYP2B11 et du CYP2B6 pour la CPA nous a permis de formuler quelques hypothèses. Tout d'abord, les résidus importants ne sont pas nécessairement proche du ou dans le site actif (Domanski and Halpert 2001). En effet, parmi les acides aminés qui diffèrent entre le CYP2B11 et le CYP2B6, seul une petite proportion se trouve réellement à proximité du substrat.

5.4.7.1. Modification du K_m vis-à-vis de la CPA (Figure 52)

- Dans le cas de la métabolisation de la CPA par les CYPs 2B11, 2B6 et les chimères, il semblerait que l'étape limitante soit celle de la formation du produit, impliquant que le K_m observé pour cette activité (K_m^C) reflète principalement les différences d'affinité des enzymes vis-à-vis de la CPA. Il a été postulé que dans ce cas, les résidus intervenant dans la reconnaissance ou l'accès au site actif du substrat sembleraient être ceux qui moduleraient la valeur du K_m^C.
- Le changement de K_m^C le plus important par rapport au CYP2B11 est présenté par la chimère G, qui contient les boucles situées entre les hélices alpha F' et G. Le module G engendre une chimère de type 2B6 lorsqu'il est échangé et englobe une partie du SRS2, semblant confirmer l'importance de cette région dans la métabolisation des substrats pour les P450s (Gotoh 1992). De plus, la boucle F-G a été identifiée comme importante pour l'activité des CYP2B (Zhao, White et al. 2006). En effet, l'analyse de trois structures cristallographiques du CYP2B4, avec ou sans ligands de tailles différentes co-cristallisés, a montré que cette région semblait posséder une capacité de mouvement importante et qu'elle adoptait des conformations différentes selon le ligand présent dans le site actif. De plus, la boucle F-G présente un repliement qui peut être très différent selon les P450s considérés (Scott, He et al. 2003 ; Scott, White et al. 2004 ; Zhao, White et al. 2006).
- Les chimères présentant des valeurs de K_m^C intermédiaires entre les deux parents, B, H et M, contiennent les modules structuraux de CYP2B6 contenant les hélices A, A', G, K' et K'', ainsi que le SRS3. Ces structures ont été déterminées comme présentant un repliement variable selon les P450s et se trouvent à proximité des structures connus comme étant flexibles, comme les boucles B-C et F-G. Les hélices A, A', G, K' et K'' se trouvent également à l'interface avec le feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique, et pourraient influencer la mobilité de la CPA si celle-ci traverse la bicouche lipidique pour accéder au site actif.
- Les fragments A, E, F, J, K, N et O, dont les substitutions sont sans effets sur le K_m^C, contiennent tout ou partie des hélices alpha D, E, F, I, J, J', K, L et L'. Excepté pour l'hélice F, ces structures ont été identifiées comme présentant des structures secondaires au repliement relativement conservé selon les CYPs, situées dans ou à proximité du cœur de la protéine, proches de l'hème et impliquées dans le bon déroulement de la monooxygénation des

substrats. Le fragment A contient le segment transmembranaire, qui, même s'il est mobile au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, présente un enchaînement de résidus hydrophobes, basiques et des prolines relativement conservé au sein des P450s microsomaux. Ces structures conservées au sein de la superfamille des P450s semblent jouer peu de rôle pour la spécificité de substrat.

Lors de cette étude, il a été postulé que les différences de K_m^C observées reflétaient les changements d'affinité des CYPs parentaux et chimériques étudiés envers la CPA, et que, sans nier l'influence du cœur de la protéine, ces changements semblaient surtout liés à des acides aminés éloignés du site actif. Il a été effectivement observé que les régions semblant posséder la plus grande influence sur le K_m^C étaient celles présentant une structure flexible (Scott, White et al. 2004 ; Zhao, White et al. 2006), en interaction avec le feuillet externe de la membrane plasmique, ou situées au niveau de l'embouchure de canaux d'accès du substrat (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008), loin du site actif. Ces régions interviendraient dans l'accès au site actif et la reconnaissance de la CPA. Il semblerait également que, comme il a été constaté précédemment (Gotoh 1992), les SRS2 et 3 seraient impliqués dans la modulation des activités CPA hydroxylase entre les P450s 2B11 et 2B6.

5.4.7.2. Modification de la constante catalytique de l'activité CPA hydroxylase : k_2^C (Figure 53)

- Il existe peu de modifications du TN des chimères qui soient réellement significatives. En effet, les constantes catalytiques des deux enzymes parentaux sont très proches, et les chimères possèdent presque toutes des k_2^C similaires à ceux de l'un de parents. Ceci serait consistant avec le fait que les résidus constituant les sites actifs des deux enzymes parentaux, censés moduler les valeurs de constantes catalytiques dans ce cas, sont identiques à l'exception d'un seul.
- Les seules baisses substantielles de TN par rapport aux deux parents sont observées pour les chimères B et E. Les modules structuraux échangés dans ces chimères contiennent les hélices A', A, E et une partie de l'hélice D. Les hélices A' et A se trouvent au niveau du feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique, proche de la structure flexible de la boucle B-C, et pourrait, de par sa position, participer à la régulation de l'accès du solvant au site actif. L'hélice E constituerait une partie de la paroi du canal S, connu pour être un canal de sortie des métabolites dans les P450s (Cojocaru, Winn et al. 2007).

La modulation de la constante catalytique de l'activité CPA hydroxylase pour les enzymes étudiés est faible. Ceci pourrait être expliqué par le fait que pour cette activité, le k_2^C *caractérise l'étape limitante de la réaction et serait surtout modulé par des résidus impliqués dans la conformation du site actif ou du canal de sortie du métabolite. Or, ces résidus sont pratiquement tous identiques pour tous les enzymes étudiés, réduisant la modification de la constante de vitesse* k_2^C*. Et en effet, les deux chimères dont la constante catalytique vis-à-vis*

de la CPA est substantiellement diminuée par rapport à tous les autres enzymes contiennent des substitutions touchant des résidus qui seraient directement impliqués dans la stabilité du complexe ES et la formation du produit de la réaction.

5.4.7.3. Modification de l'efficacité catalytique des enzymes : rapport k_2^C/K_m^C (Figure 54)

- Dans une réaction enzymatique de cinétique michaëlienne, lorsque la concentration de substrat [S] est très inférieure au K_m, alors très peu de complexe ES est formé. Ceci équivaut à considérer que la concentration d'enzyme [E] libre est équivalente à la concentration d'enzyme totale $[E]_T$. L'équation de Michaëlis – Menten $v_i = \frac{k2[E]_T[S]}{K_m + [S]}$ devient alors une réaction d'ordre deux

$$v_i = \frac{k_2}{K_m}[E]_T[S] \approx \frac{k_2}{K_m}[E][S]$$

où k_2/K_m est la constante de vitesse apparente d'ordre deux de la réaction enzymatique. Dans ce cas, la vitesse de réaction varie selon la fréquence des rencontres entre l'enzyme et le substrat, et k_2/K_m permet de mesurer l'efficacité catalytique de l'enzyme.

- Les chimères A, F, J, K, N et O présentent une efficacité similaire à celle du CYP2B11, indiquant que ces modules structuraux ne seraient pas impliqués dans la différence d'efficacité catalytique entre les enzymes CYPs 2B6 et 2B11 envers la CPA. Ces modules, comme constaté pour la modulation du K_m^C, contiennent majoritairement des éléments proches du cœur de la protéine, possédant un repliement conservé entre les différents P450.
- Les chimères E, G, H et M, présentent une efficacité intermédiaire à celle des deux parents. Ces modules contiennent tout ou partie des hélices D, E, F', G, K' et K''. Toutes ces hélices constituent des parois ou des embouchures de canaux d'accès ou de sortie des substrats au site actif des P450s.
- Seule la chimère B présente une efficacité similaire à celle du CYP2B6, ce qui montrerait que les structures secondaires de ce module seraient impliquées en partie dans le fait que les rencontres entre le CYP2B11 et la CPA donnent plus souvent lieu à une catalyse que lorsque le CYP2B6 rencontre la CPA. Il a été postulé que les substitutions induites par l'échange du module B pouvaient induire une certaine fermeture et rigidification du site actif, ainsi qu'un accès du substrat au site actif facilité dans le CYP2B11 par rapport à la chimère B (Bathelt, Schmid et al. 2002).

Il semblerait que les résidus constituant la paroi ou l'embouchure des canaux du P450 ainsi que les résidus des hélices A' et A seraient importants pour le maintien d'une bonne efficacité catalytique du CYP2B11 par rapport au CYP2B6 envers la CPA.

5.4.7.4. Affinités vis-à-vis de la CPA et de l'EFC (Figure 55)

- L'absence d'activité 7-EFC deethylase de 6 chimères sur 15 réduit la vue d'ensemble, mais il est malgré tout possible de poser des hypothèses à partir des observations effectuées.

En considérant que le K_m équivaut au K_s, et donc à la mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, il est alors possible de considérer la comparaison des valeurs de K_m pour les réactions de CPA hydroxylation et de 7EFC deethylation comme un moyen d'étude de la discrimination de substrat pour les enzymes parentaux et les chimères.

Dans ce cas, les groupes observés dans la représentation log-log de l'affinité des enzymes pour l'EFC en fonction de l'affinité des enzymes pour la CPA (Figure 55) représenteraient trois types de discrimination distincts. L'appartenance à un même groupe traduirait alors un mécanisme de discrimination commun.

- Le groupe contenant les chimères B, F, H et O posséderait alors un mode de discrimination différent des deux enzymes parentaux. Ces chimères présentent des substitutions au niveau des hélices alpha A, A', F, G et L', les feuillets beta 3-3 et 3-2, ainsi qu'au niveau des SRS 2, 3 et 6.
- Ces structures impliquées sont considérées comme mobiles, les hélices F et G encadrant la boucle F-G, flexible (Zhao, White et al. 2006). La majorité de ces structures sont également proches ou en interaction avec le feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique.
- L'implication de trois SRS sur six dans les mécanismes de discrimination de substrat est cohérente avec les résultats précédemment obtenus, ayant mis en évidence le rôle de ces structures dans la spécificité de substrat (Gotoh 1992 ; Domanski and Halpert 2001).

5.4.7.5. Inactivité des chimères D, I et L

- Les chimères I et L contiennent des substitutions pour des acides aminés se trouvant proches du site actif (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) et interagissant directement ou indirectement avec des résidus impliqués dans la liaison du substrat.
- La chimère D contient une substitution proche des acides aminés impliqués dans l'interaction avec la réductase, capitale pour un couplage et une métabolisation correcte de la CPA. La circulation des électrons de la réductase vers l'hème peut en effet être perturbée par un environnement électrostatique inadéquat.

Dans ces trois cas, les substitutions impliquées sont localisées au niveau de structures secondaires critiques pour la fonctionnalité du P450, soit proches du cœur de la protéine soit au niveau des régions d'interaction avec les partenaires redox. La rupture des interactions entre résidus lors de la substitution de ces fragments aurait induit la non fonctionnalité.

5.5. Conclusions

La création et l'analyse de l'activité métabolique de la banque de chimères ordonnées entre le CYP2B11 et le CYP2B6, différents pour la métabolisation de la CPA, a permis de tirer plusieurs conclusions.

Tout d'abord, malgré le faible nombre de chimères générées, des différences de comportement entre les diverses chimères ont été observées. En effet, certaines présentent des comportements proches de l'un ou l'autre des enzymes parentaux mais il en existe certaines étant totalement différentes des deux parents. De plus, sur 15 chimères générées, 12 se sont avérées actives pour la CPA, cette proportion pouvant être améliorée avec l'utilisation de logiciels dédiés tel que SCHEMA (Meyer, Silberg et al. 2003), pour des enzymes présentant des homologies de séquence plus faibles.

Ceci confirme le bien-fondé de la génération de banques ordonnées de chimères, permettant d'obtenir une quantité d'information précise importante et une très bonne proportion d'enzymes fonctionnels, tout en n'exigeant pas une méthode expérimentale à haut débit pour le test d'activité des variants générés. De plus, le faible nombre de chimères testées nous permet d'effectuer facilement la modélisation des enzymes, ainsi que des tests d'activité des enzymes envers d'autres substrats.

Concernant les constantes enzymatiques des enzymes parentaux et des chimères, leur calcul a permis de déduire que pour l'activité CPA hydroxylase de ces enzymes, il semblerait que l'étape limitante soit celle de formation du produit. Les constantes catalytiques sont en effet de l'ordre de la dizaine de min^{-1}, des valeurs faibles mais courantes pour des P450s de mammifère en interaction avec des partenaires redox (Guengerich 1991). Le cas où la première étape est limitante s'observe plus souvent pour les CYPs bactériens comme le P450BM3 où le transfert d'électrons a lieu entre deux domaines de la même protéine (constante catalytique d'environ 10^3 min^{-1} pour des acides gras (Narhi and Fulco 1986)) ; ou pour des P450s tels que la thromboxane synthase, n'utilisant pas de donneur d'électrons externe (constante catalytique d'environ 10^6 min^{-1} pour la prostaglandine (Wang, Tsai et al. 2001)).

La lenteur de la deuxième étape pourrait expliquer les résultats obtenus, qui semblent indiquer que la valeur de la constante de Michaëlis des P450s étudiés pour la CPA est surtout modulée par des résidus situés en dehors du site actif, régulant la reconnaissance et l'accès au site actif de la CPA.

Le faible nombre de substitutions localisées contenues dans les modules a permis de formuler des hypothèses sur l'implication de certains résidus des modules sur l'activité du CYP2B11 par rapport au CYP2B6 envers la CPA.

Le rassemblement des informations obtenues montre ainsi que les résidus contenus dans les modules structuraux G, H et M sembleraient importants pour l'affinité K_m^C importante du CYP2B11 pour la CPA par rapport au CYP2B6. De même, le module B comporterait des résidus intervenant dans la différence d'efficacité catalytique k_2^C/K_m^C des CYP2B6 et

CYP2B11. Le module E, quant à lui, contiendrait des résidus modulant la constante catalytique k_2^C de la CPA hydroxylation entre les deux enzymes parentaux.

D'autre part, il semblerait que les substitutions localisées au niveau de structures secondaires au cœur de la protéine n'induisent pas de changements dans les constantes enzymatiques du CYP2B11 par rapport au CYP2B6 pour l'activité CPA hydroxylase.

Certains résidus des modules D, I et L, relativement proches de l'hème, ont également été identifiés comme étant potentiellement essentiels à la fonctionnalité du CYP2B11 pour la métabolisation de la CPA.

Les résultats vont également dans le sens de l'implication des résidus localisés au niveau des SRS dans la modulation du K_m des P450s 2B6 et 2B11 envers la CPA.

L'évaluation du K_m de l'activité EFC deethylase des enzymes, et sa comparaison avec le K_m^C, a également montré que les SRS, comme postulé précédemment (Gotoh 1992), seraient impliqués dans la spécificité de substrat des P450s.

Les résidus identifiés comme importants lors de notre expérience n'avaient, pour certains, jamais été mentionnés dans de précédentes études sur l'activité des CYP2B6 et 2B11 vis-à-vis de divers substrats. Certains de ces résidus se trouvent également en dehors des SRS ou des régions identifiées précédemment comme importantes pour les activités des CYPs 2B11 et 2B6. Il est possible que ces résidus n'auraient pas été considérés lors d'expériences de mutagenèse dirigée. Et selon les lois de probabilité, ils auraient pu ne pas être produits lors d'expériences de mutagenèse à haut débit. La méthode de chimérogenèse réalisée ici, se situant à mi-chemin entre ces deux types d'approche, nous permet de les mettre en évidence.

.

6. Partie 3 :

Cytotoxicité de la CPA et systèmes rapporteurs

6.1. CONTEXTE 169

6.2. METHODOLOGIE 169

6.3. RESULTATS 170

6.3.1. Test en gouttes d'effet sur la croissance 170

6.3.2. Test de viabilité et aptitude à la respiration 170

6.3.3. Test de croissance en milieu liquide 171

6.3.4. Caractérisation de la bioconversion de la CPA par des levures entières et analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) et Spectrométrie de Masse (SM) 172

6.3.5. Construction du plasmide rapporteur 175

6.3.6. Test du plasmide rapporteur 177

6.3.7. C.elegans : Utilisation de surnageant de levure 177

6.3.8. C.elegans : Utilisation du mafosfamide 178

6.4. DISCUSSION 180

6.4.1. Génotoxicité de la CPA chez S.cerevisiae W303 180

6.4.2. Systèmes rapporteurs pour l'évaluation de l'activité des variants chimériques de P450 181

6.5. CONCLUSIONS 182

6.1. Contexte

Un des principaux obstacles à la réalisation de processus d'évolution dirigée sur les P450s de mammifère provient de la difficulté à mettre en place un crible à haut débit pour la fonctionnalité et la mesure des caractéristiques cinétiques des enzymes. La plupart des tests aujourd'hui reposent en effet sur une réponse "tout ou rien", utile pour la sélection des clones fonctionnels mais laissant un grand nombre de mesures fastidieuses à réaliser (Parikh, Josephy et al. 1999 ; Abecassis, Urban et al. 2003). De plus, la localisation membranaire de ces CYPs microsomaux rend plus difficile leur expression hétérologue, leur fonctionnalité dépendant de l'expression correcte et du bon positionnement de ses partenaires redox.

Or, en plus du système de construction de chimères, nous souhaitions réaliser une mutagenèse à haut débit sur le CYP2B6 afin de générer un enzyme optimisé pour la métabolisation de la CPA. Pour ceci, il était nécessaire de mettre au point un test afin d'évaluer l'activité 4-OH CPA hydroxylase des P450s mutés. Le microorganisme semblant présenter un bon compromis pour ce rôle était la levure, eucaryote facile à manipuler et capable de reconstituer un "système P450" fonctionnel. De plus, le produit de la métabolisation de la prodrogue est génotoxique, permettant de s'inspirer des tests de génotoxicité déjà existants pour la levure, utilisant RAD54 et mettant en jeu un système de gène rapporteur Green Fluorescent Protein (GFP), tel le test Green Screen (Cahill, Knight et al. 2004). Cependant, la souche de ce test, ne possédant pas de système d'activation de prodrogue interne, avait abouti à une absence d'effet de la CPA dans le cadre de ce protocole (Knight, Billinton et al. 2007).

En plus de la levure, nous nous sommes également intéressé à *C.elegans*, un ver nématode d'environ 1mm de long (Brenner 1974). Même si les nématodes sont le plus souvent choisis pour des tests concernant le développement, *C.elegans* a aussi été utilisé dans le cadre d'essais à haut débit concernant la cytotoxicité de produits antifongiques (Breger, Fuchs et al. 2007). C'est un organisme eucaryote simple, à la fois anatomiquement et génétiquement, croissant en 3 jours en 4 stades larvaires avant l'adulte. Il est relativement simple de transformer de l'ADN exogène, comme le gène d'une protéine fluorescente ou d'un enzyme, de façon permanente dans le nématode et de créer ainsi des lignées transgéniques, maintenues facilement en milieu liquide ou solide (Brenner 1974) et pouvant être congelées (Mello, Kramer et al. 1991).

. De plus, le système de réparation de l'ADN étant particulièrement bien conservé chez les eucaryotes (Cahill, Knight et al. 2004), il existe un homologue de RAD54 chez *C.elegans* (GenBank n° NC_003279). *C.elegans* a donc paru indiqué pour la mise au point d'un test innovant pour la génotoxicité d'une prodrogue telle que la CPA.

6.2. Méthodologie

La souche de *S.cerevisiae* W(R)2B6 (voir Annexe I), exprimant le CYP2B6 de façon inductible (Gervot, Rochat et al. 1999), est capable de transformer la CPA en son premier métabolite, la 4-OH CPA. La toxicité des produits découlant de ce métabolite a été testée sur

différentes souches de levure dans différentes conditions. W(R)2B6 et W(R)2B11 ont également été caractérisées pour leur bioconversion en cellules entières de la CPA en 4-OH CPA. S'inspirant du test Green Screen de génotoxicité dans la levure qui utilise le promoteur d'un gène intervenant dans la réparation de l'ADN (RAD54) associé à un gène rapporteur (GFP), un plasmide proche a été construit au laboratoire afin d'évaluer l'effet génotoxique de la moutarde, issue de la 4-OH CPA. En effet, la GFP est une protéine robuste exprimée efficacement par la levure, et dont la fluorescence est facilement détectable (Cahill, Knight et al. 2004). En parallèle, l'activation de ce plasmide rapporteur par certains produits, testés positifs pour la génotoxicité avec Green Screen, a été testée afin d'évaluer l'efficacité du système. (Les protocoles de toutes ces expériences sont détaillés en Annexe I Partie 3).

En ce qui concerne *C.elegans*, nous avons d'abord évalué l'effet de la cyclophosphamide et de ses métabolites sur cet organisme. Le surnageant d'une culture de levure exprimant le CYP2B11, plus actif que le CYP2B6, traitée ou non avec de la CPA, a été utilisé afin de traiter des vers à différents stades de leur cycle cultivés en milieu liquide, leur nombre et leur aspect ayant été observé à différents temps de culture. Un éventuel effet toxique sur les œufs et la fertilité de la descendance a également été évalué. Pour estimer l'effet des métabolites de la CPA sur *C.elegans*, des vers en culture liquide ont été mis en contact avec du mafosfamide à différentes concentrations et l'effet de ce produit sur les œufs a été estimé.

6.3. Résultats

6.3.1. Test en gouttes d'effet sur la croissance

Des suspensions de la souche W(R)2B6 (voir Annexe I), ont été déposées sur des boîtes induisant ou inhibant la production de CYP2B6 et contenant différentes concentrations de CPA (Annexe I 8.4.1). Les clones déposés sur les boîtes inhibant l'expression ne présentent pas de différence d'aspect entre eux ou avec la boîte témoin, de même pour les boîtes induisant l'expression. Cette absence d'un effet-dose du produit sur des levures capables de métaboliser la CPA semble indiquer qu'il n'existe pas de toxicité de ce produit sur les cellules.

6.3.2. Test de viabilité et aptitude à la respiration

La méthode utilisée afin d'évaluer l'effet d'un agent génotoxique sur la levure est l'estimation de son aptitude à former des colonies après exposition à cet agent. Mais il est également possible de réaliser un test basé sur l'intégrité du génome mitochondrial qui conditionne la respiration. En effet, le chlorure de 2,3,5-triphenyl tetrazolium (TTC) permet de tester facilement l'intégrité respiratoire (Ogur, St. John et al. 1957 ; Bachofen, Schweyen et al. 1972 ; Conconi, Jager-Vottero et al. 2000). Le TTC est un produit légèrement jaune qui est réduit par le complexe cytochrome oxydase mitochondrial de la levure en un produit rouge foncé, le formazan. Si l'agent étudié altère le métabolisme respiratoire mitochondrial, alors les colonies touchées deviendront incapables de transformer le TTC et resteront blanches. Nous avons utilisé le TTC afin de comparer l'effet de la CPA sur des levures exprimant ou non le

CYP2B6 (cf. Annexe I). Les levures sont incubées en milieu liquide avec de la CPA durant différents temps, puis étalées sur des boîtes de Pétri en absence ou en présence de TTC.

Le fait que les clones étalés sur les boîtes contenant du TTC sont tous uniformément roses, combiné au fait que le nombre de clones ne varie pas significativement selon la souche étudiée, le temps de traitement pour chaque souche ou la présence ou l'absence de TTC nous indique que la CPA ne semble pas avoir d'effet mutagène mitochondrial détectable.

6.3.3. Test de croissance en milieu liquide

L'estimation de la croissance de la levure en milieu liquide est une méthode simple et relativement sensible pour tester l'éventuel génotoxicité d'un produit car elle permet de détecter des changements phénotypiques même mineurs (Toussaint and Conconi 2006 ; Toussaint, Levasseur et al. 2006). La mesure de la densité optique étant un bon paramètre de mesure de la croissance de *S. cerevisiae*, elle a été utilisée afin de comparer la croissance des souches exprimant ou non le CYP2B6, en présence ou en absence de cyclophosphamide. En plus du simple aspect des courbes de croissance elles-mêmes, il est possible de modéliser mathématiquement les courbes obtenues et d'en retirer certains paramètres (Figure 79).

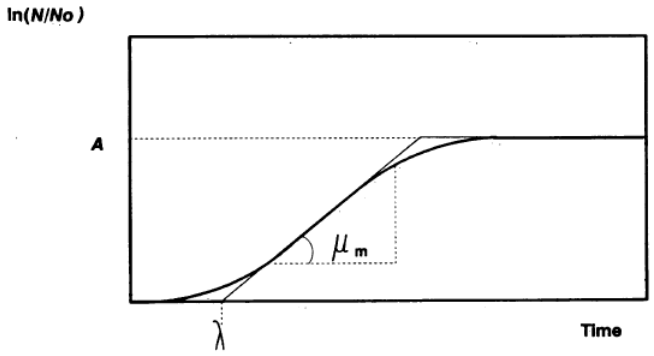


Figure 79. Courbe de croissance typique. Représentation du logarithme du nombre de cellules présentes divisée par le nombre de cellules initiales en fonction du temps. (Zwietering, Jongenburger et al. 1990).

En effet, après une phase où le taux de croissance, μ (pente de la tangente à la courbe), est nul, celui-ci augmente progressivement jusqu'à un maximum (μm sur la Figure 79). Pour terminer, le taux diminue lentement jusqu'à redevenir nul, atteignant une asymptote dont l'intersection avec l'axe des ordonnées, A sur la Figure 79, indique le nombre maximal d'individus présents dans la culture. Un dernier paramètre, λ sur la Figure 79, est représenté par l'intersection de la tangente au point de la courbe présentant le taux de croissance maximal avec l'axe des abscisses. Il correspond au temps de latence de l'organisme

Plusieurs modèles mathématiques ont été adaptés et testés afin de décrire les courbes de croissance de divers organismes. Nous avons utilisé celui décrit par Richards, qui semble être un des plus adaptés, notamment dans le cadre de mesure de densité optiques (Lopez, Prieto et al. 2004).

En premier lieu, les éventuelles différences de croissance entre W(R) et W(R)2B6 sont mesurées dans plusieurs conditions de culture différentes, afin de vérifier que l'expression de la protéine en elle-même n'influe pas directement sur la croissance des levures (Figure 80).

Les profils de courbe sont proches, seule la concentration finale de la culture de W(R) dans le milieu minimum synthétique galactosé SW5, induisant l'expression de CYP2B6, semble légèrement différente. Les paramètres de croissance λ et μm sont ensuite calculés grâce au modèle de Richards. Les taux de croissance maximaux sont légèrement plus élevés et le temps de latence légèrement plus faible pour les cultures en milieu minimum synthétique glucosé SW10, inhibant l'expression de CYP2B6, ce qui correspond au fait que la souche W303 croît plus facilement en milieu glucosé. Globalement, il n'existe pas de différences observées entre les deux souches W(R) et W(R)2B6, les légères variations sont donc uniquement dues au milieu de croissance et non à la production de protéines.

En ce qui concerne la mise en présence de la souche W(R) 2B6 avec de la CPA, la comparaison des profils de courbe (Figure 81) montre qu'il n'existe pas de différences de croissance entre les souches traitées et non traitées, que la souche produise ou non du CYP2B6. Les temps de latence sont pratiquement identiques et la seule différence est observée ici au niveau des taux de croissance maximaux, selon le milieu utilisé. La diminution du taux de croissance maximal en SW5 peut à nouveau être expliquée par la pousse moins efficace de la souche en milieu galactosé. Il n'existe donc pas d'effet de la CPA sur la croissance des levures en milieu liquide.

6.3.4. Caractérisation de la bioconversion de la CPA par des levures entières et analyse par CLHP - SM

6.3.4.1. Caractérisation de la bioconversion de la CPA par les CYPs 2B11 et 2B6 exprimés dans S.cerevisiae

Après détermination du profil chromatographique et du spectre de masse de la CPA et de son métabolite (cf. Annexe I et Annexe II), la métabolisation de la CPA dans les levures exprimant les CYPs2B11 et 2B6 est analysée. Il est possible de tracer une courbe de mesure de l'activité des CYP2B6 (Figure 82) et CYP2B11 (Figure 83) dans les levures entières, indiquant une fonctionnalité de ces enzymes lorsqu'elles sont exprimées dans cet organisme.

Les constantes cinétiques déduites de ces courbes sont un K_m pour le CYP2B6 et le CYP2B11, respectivement de 22,3 ± 4 et de 13,5 ± 6 mM. Les TNs pour le CYP2B6 et le CYP2B11 sont respectivement de 0,04 ± 0,02 et 0,04 ± 0,01 fmol/min/cellule.

L'observation des courbes obtenues lors de la mesure de l'activité CPA hydroxylase des CYP2B6 et CYP2B11 nous permet de remarquer qu'il n'existe pas de phénomène de saturation de ces enzymes aux concentrations de CPA choisies. Mais pour des raisons de solubilité du substrat dans l'éthanol, il n'est pas possible de tester des concentrations supplémentaires de CPA. Il est possible que les fortes erreurs standard observées pour le calcul du K_m proviennent du fait que l'enzyme n'est pas saturé aux concentrations maximales testées.

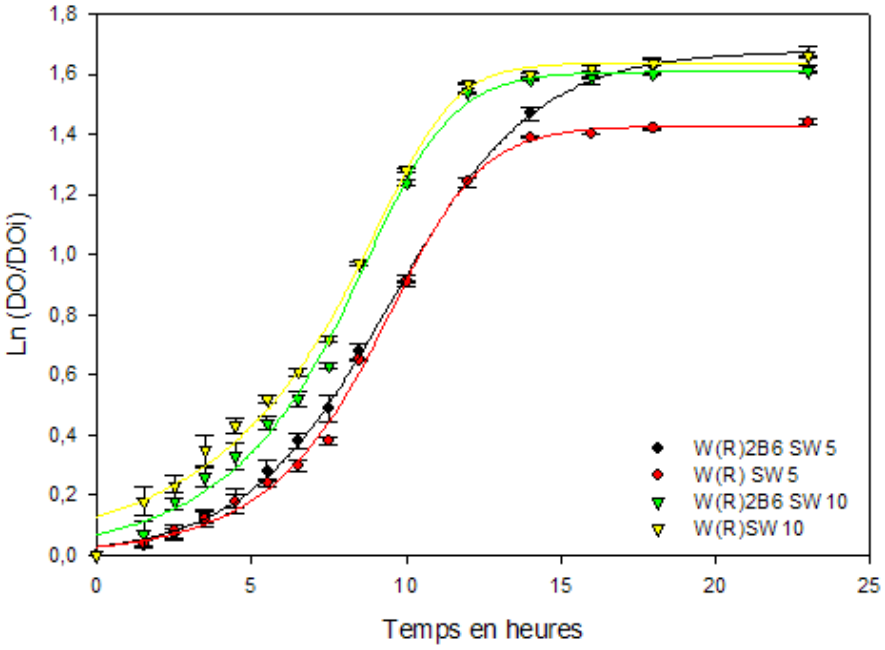


Figure 80. Croissance des cultures des souches W(R) et W(R)2B6 en fonction du temps et du milieu de culture utilisé . Le ln de la densité optique (DO) des cultures à 600 nm divisé par la DO initiale des cultures (DOi) est utilisé comme paramètre de croissance. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 2 mesures indépendantes. Les courbes sont construites grâce au modèle de Richards (Zwietering, Jongenburger et al. 1990).

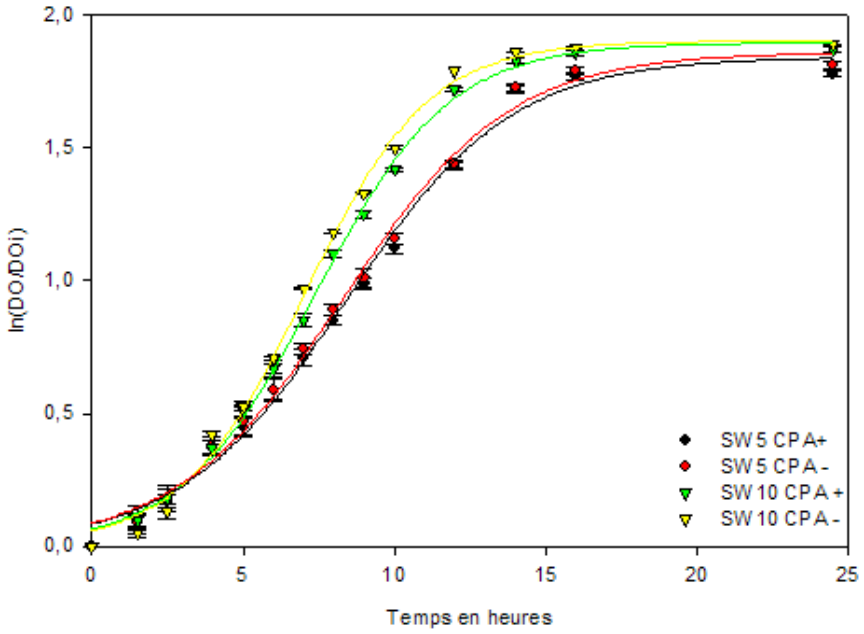


Figure 81. Croissance des cultures de la souche W(R)2B6 en fonction du temps, du milieu de culture utilisé et de la présence (CPA+) ou de l'absence (CPA-) de CPA. Le ln de la densité optique (DO) des cultures à 600 nm divisé par la DO initiale des cultures (DOi) est utilisé comme paramètre de croissance. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 2 mesures indépendantes. Les courbes sont construites grâce au modèle de Richards (Zwietering, Jongenburger et al. 1990).

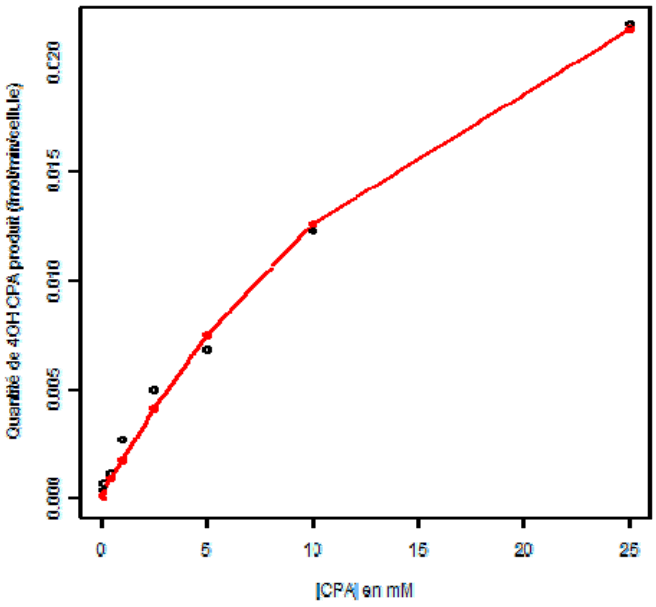
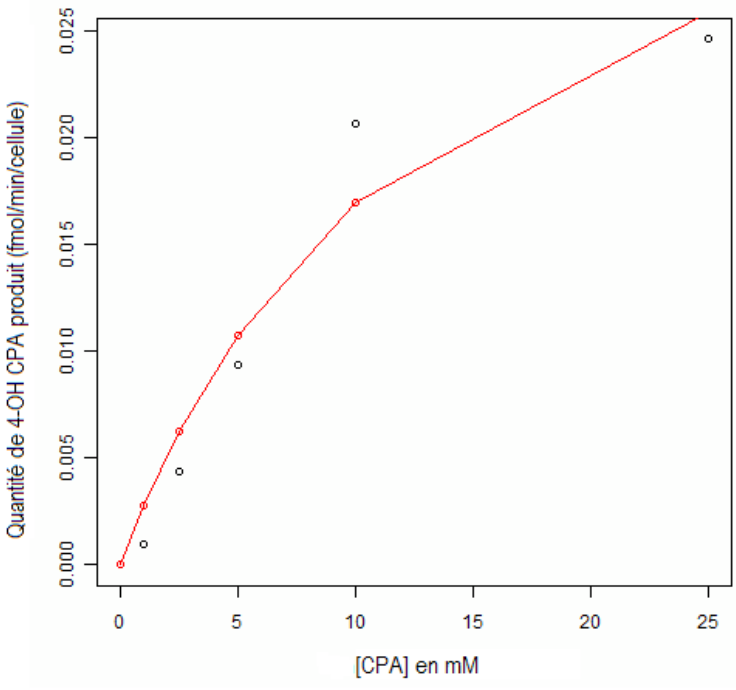


Figure 82. Activité CPA hydroxylase du CYP2B6 dans les levures entières. L'analyse de la cinétique enzymatique de la 4-hydroxylation de la CPA a été réalisée selon le protocole exposé en Annexe I, en utilisant une souche de levure exprimant le CYP2B6 et surexprimant la P450 réductase de levure, W(R)2B6. Les constantes cinétiques du CYP2B6 pour la CPA ont été déterminées en utilisant 8 concentrations de CPA (0,05 mM à 25 mM). Le K_m et la V_{max} ont été calculés en utilisant un programme écrit avec le logiciel R.

Figure 83. Activité CPA hydroxylase du CYP2B11 dans les levures entières. L'analyse de la cinétique enzymatique de la 4-hydroxylation de la CPA a été réalisée selon le protocole exposé en Annexe I, en utilisant une souche de levure exprimant le CYP2B11 et surexprimant la P450 réductase de levure, W(R)2B11. Les constantes cinétiques du CYP2B11 pour la CPA ont été déterminées en utilisant 8 concentrations de CPA (0,05 mM à 25 mM). Le K_m et la V_{max} ont été calculés en utilisant un programme écrit avec le logiciel R.



Les K_m obtenus sont beaucoup plus élevés que ceux de la littérature (Chen, Lin et al. 2004) (Domanski, Schultz et al. 1999) (Nguyen, Tychopoulos et al. 2008) ou ceux exposés en Partie 2 (Tableau 4), calculés à partir d'expériences effectuées avec des microsomes. Ceci peut être du au fait que la paroi des levures empêche la pénétration optimale de la CPA dans les cellules, diminuant les contacts entre l'enzyme et son substrat. Le CYP2B11 présente un K_m plus faible que le CYP2B6, mais le rapport des K_m de ces deux enzymes est moindre que celui observé avec des microsomes. Il est possible que l'environnement cellulaire ainsi que les difficultés de pénétration change les paramètres de métabolisation des enzymes, modifiant leurs affinités apparentes respectives.

6.3.4.2. Analyse de la cinétique des métabolites du CPA sur levures entières

Les levures W(R)2B6 produisant le CYP2B6 et traitées avec de la CPA, et les surnageants prélevés à intervalles de temps réguliers sont analysés en CLHP-SM (voir Annexe I). Le métabolite produit dans la levure semble suivre une cinétique de type production - destruction assez progressive. Pour les valeurs obtenues entre 1 et 12h (Figure 84), il est possible d'effectuer une approximation de cette cinétique par une courbe de tendance logarithmique.

6.3.5. Construction du plasmide rapporteur

En s'inspirant du test de génotoxicité Green Screen, un plasmide rapporteur, pLCJ, a été construit (Figure 85), afin de placer une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur de RAD54. Il est issu de la combinaison de trois éléments.

- Le premier élément est constitué des 600 paires de bases situées en amont du codon d'initiation du gène de RAD54, extrait par PCR de l'ADN génomique de la levure. C'est un des gènes induit dans la réponse de la levure aux agents alkylants (Cole, Schild et al. 1987 ; Jelinsky and Samson 1999), découvert lors de tests de sensibilité de mutants de levure aux rayons UV (Game and Mortimer 1974). La protéine RAD54 semble en effet jouer un rôle central au sein du complexe protéique RAD52, intervenant dans le mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Heyer, Li et al. 2006).Ce type de réparation est majoritairement utilisé dans le cadre de cassures double brin ou de fourches de réplication bloquées (Wolner, van Komen et al. 2003), qui sont les principales conséquences du traitement par la CPA. RAD54 fait partie de la famille Snf-2 des hélicases SF2, qui comprend un nombre important de protéines capables de remodeler l'ADN (Peterson 1996).
- Le deuxième élément est la phase ouverte de lecture de la yeast enhanced green fluorescent protein 1 (yEGFP1) (Cormack, Bertram et al. 1997) issue d'un recodage de la GFP originelle afin d'obtenir une meilleure expression de la protéine dans la levure, possédant ainsi deux mutations (F64L, S65T) permettant d'améliorer la fluorescence de la protéine. Cette phase ouverte de lecture est originaire du plasmide pKT127 (Sheff and Thorn 2004), où elle est suivie du terminateur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ADH1). yEGFP1, le terminateur de l'ADFH1 et la phase codante du gène de résistance à la kanamycine ont été extraits de pKT127 et intégrés juste à la suite de la séquence promotrice de RAD54 (Figure 85).

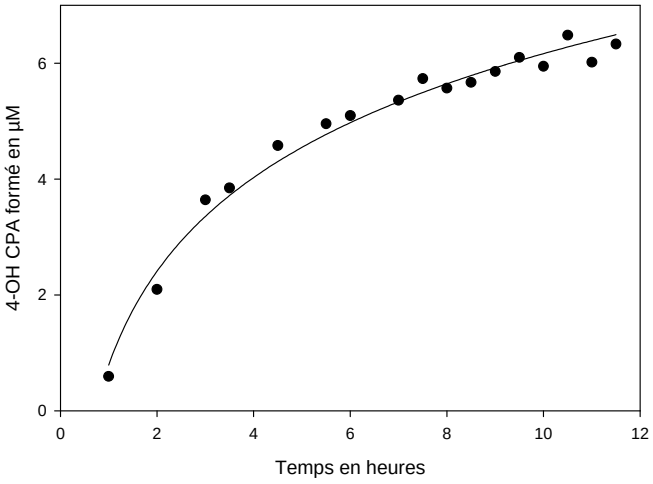


Figure 84. 12 premières heures de la production de 4OH CPA par des levures entières en fonction du temps.

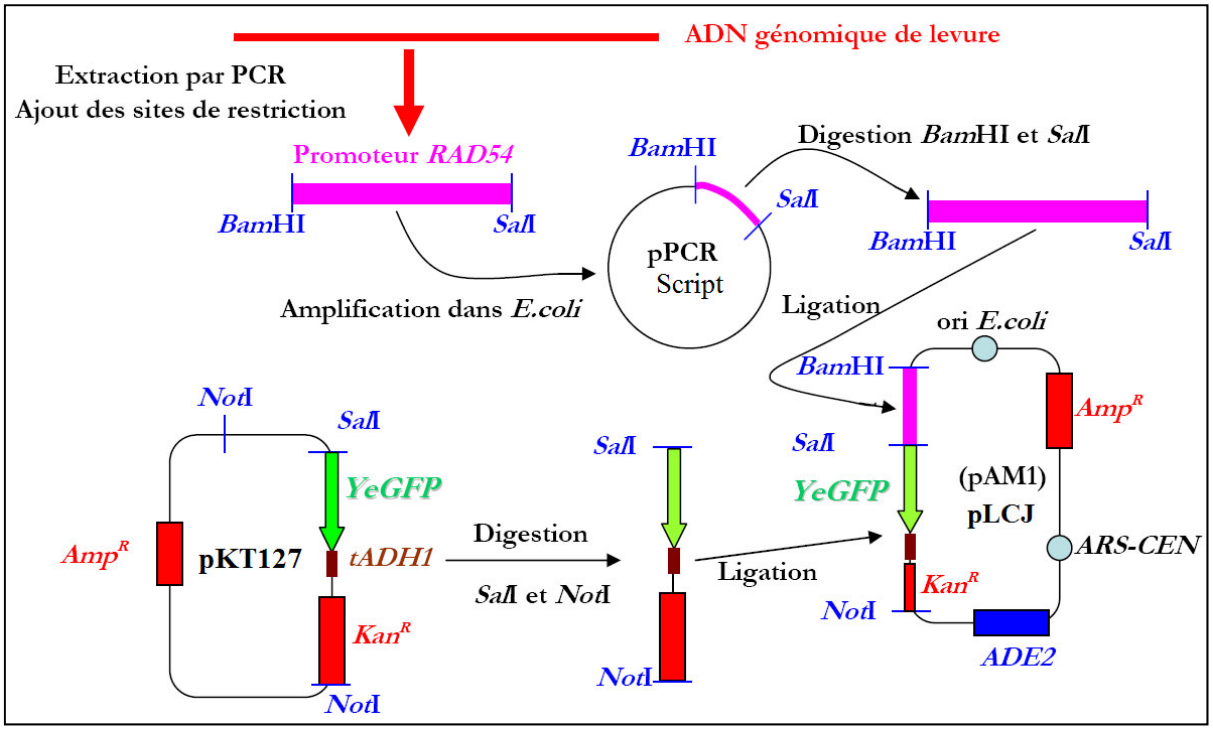


Figure 85. Construction du plasmide rapporteur pLCJ à partir des plasmides pKT127, pAM1 et des séquences promotrices du gène RAD54. Amp^R et Kan^R sont deux gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. ori *E.coli* et ARS-CEN sont deux origines de réplication chez la bactérie et la levure, respectivement. ADE2 est le marqueur d'auxotrophie à l'adénine, tADH1 est le terminateur du gène ADH1 de levure.

- Le troisième élément est le vecteur navette pAM1, utilisé dans son intégralité comme squelette de pLCJ. Il comporte le gène de la résistance à l'ampicilline et celui de la phosphoribosylamino-imidazole-carboxylase complémentant l'auxotrophie en adénine des souches utilisées. Il contient également deux origines de réplication : une permettant sa réplication dans *E.coli* et une permettant sa réplication dans la levure. Cette dernière est associée à une séquence centromérique permettant au plasmide de se comporter comme un "mini chromosome" maintenant ce plasmide à un nombre de copies proche de 1 (Gunge 1983). Ceci est nécessaire afin de pouvoir évaluer de façon quantitative l'activité 4-OH CPA hydroxylase des mutants, dont l'intensité de fluorescence observée est alors uniquement liée à l'induction du promoteur de RAD54 du plasmide (Hitchcock, Kahana et al. 2005).

6.3.6. Test du plasmide rapporteur

Le plasmide pLCJ est transformé dans la souche W(R) et dans la souche W(R) 1A1, exprimant le CYP1A1. Ces deux souches de levure sont traitées par deux produits, selon le protocole utilisé par le test Green Screen (voir Annexe I) : le chloramphénicol, directement cytotoxique et génotoxique pour *S.cerevisiae*, et le benzo(a)pyrène (B(a)P), génotoxique après activation par le CYP1A1 notamment (Knight, Billinton et al. 2007).

La mesure de l'absorbance des cultures de ces deux souches, ainsi que de leur fluorescence à une longueur d'onde adéquate, montrent des résultats en contradiction avec ceux attendus selon les critères utilisés pour le test Green Screen (voir Annexe II Tableau 6,Tableau 7Tableau 8Tableau 9).

En effet, le B(a)P est détecté comme cytotoxique alors qu'il n'est pas censé l'être. La génotoxicité du BAP semble s'exercer sur les souches W(R)V60 et W(R)pLCJ, ne possédant pas de systèmes d'activation capables de métaboliser le B(a)P en métabolites toxiques. De plus, le chloramphénicol semble ne pas induire de stimulation de la fluorescence des souches testées alors qu'il est détecté comme cytotoxique directe par le test Green Screen. Ces résultats et certaines valeurs obtenues pour le calcul de certains paramètres montreraient que l'expression de la GFP de pLCJ n'est pas stimulée, ou alors insuffisamment, par ces produits de référence.

6.3.7. *C. elegans* : Utilisation de surnageant de levure

Une culture liquide d'animaux à divers stades de croissance est traitée avec du surnageant de levure W(R)2B11, traitée ou non avec 25 mM de CPA. Dans la culture traitée, il y a donc une coexistence de la CPA avec environ 100 µM de 4-OH CPA. L'évolution du nombre moyen d'animaux se trouvant dans la culture en fonction du temps est représentée en Figure 86. Les éventuels œufs présents ne sont pas pris en compte dans cette estimation.

Malgré le fait que les animaux se trouvent à des stades différents au début de l'expérience, une tendance se détache au niveau de l'évolution de chacune des cultures. Il existe une absence de ponte des animaux cultivés en milieu liquide en présence de CPA, ainsi qu'un retard de ponte des animaux traités déposés sur boîte, par rapport au témoin.

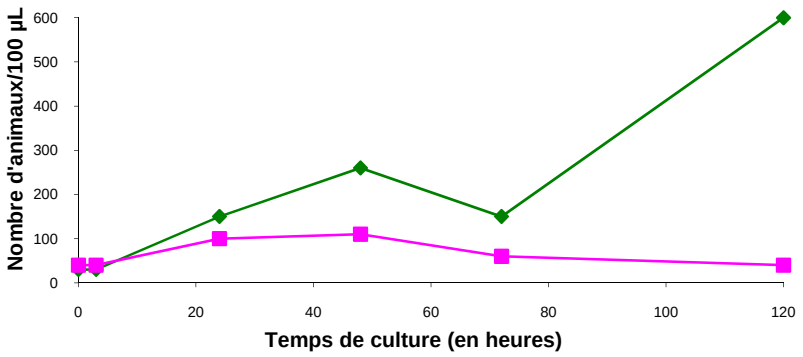


Figure 86. Evolution en fonction du temps du nombre de vers présents dans 100 µL d'une culture de surnageant de levure traité avec 25 mM de CPA (en rose) ou du solvant (en bleu). A 48h, la même proportion de chaque culture est prélevée et transférée dans du milieu frais puis remise à cultiver.

La CPA et/ou son métabolite semble donc exercer un certain effet sur la fertilité des nématodes, induisant une rétention d'œufs par les adultes et une certaine toxicité sur les œufs avant la ponte. Une autre différence observée est la formation d'agglomérats bactériens importants dans la culture liquide témoin, absents de la culture traitée, pouvant indiquer un effet de la CPA sur la source de nourriture des vers.

Les œufs une fois déposés sur milieu NGM frais, ils éclosent normalement et les individus issus des deux cultures se développent classiquement et de façon identique, atteignant leur phase de ponte de façon synchrone. Malgré tout, l'effet de la CPA ne semble pas mutagène, les individus issus des œufs éclos sur les boîtes ne présentant pas d'anomalies. Afin de vérifier lequel des deux composés est actif, les vers sont traités avec du mafosfamide introduit dans leur milieu de culture classique.

6.3.8. *C.elegans* : Utilisation du mafosfamide

Des vers, synchronisés afin de se trouver tous au même stade larvaire, sont traités avec une forte concentration de mafosfamide. Les animaux sont prélevés à intervalles réguliers et observés le dernier jour de l'expérience. Les boîtes présentent toutes environ le même nombre d'individus qui sont restés synchrones tout au long de la culture.

En ce qui concerne les animaux de chaque boîte mis à pondre l'avant dernier jour de l'expérience, tous ont pondu un nombre relativement identique d'œufs dans le même laps de temps. Le lendemain, quelques œufs non éclos ont été observés sur ces boîtes mais il n'existe aucune différence significative (test de Mann Whitney) entre les animaux traités et témoins. Tout ceci indique une non toxicité du mafosfamide seul sur les vers.

En résumé, il a été observé, grâce à une analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse, que la levure est capable de métaboliser correctement la CPA en 4-OH CPA. Le CYP2B6 qu'elle exprime est donc fonctionnel. Mais malgré ceci, le traitement de la levure, exprimant ou non le CYP2B6, par la CPA ne semble pas affecter celle-ci d'une manière quelconque dans le cadre des différents tests utilisés. C.elegans, quant à lui, ne semble pas non plus être sensible à la toxicité du métabolite de la CPA

6.4. Discussion

6.4.1. Génotoxicité de la CPA chez *S.cerevisiae* W303

Peu d'expériences ont été réalisées, qui utilisaient une souche de levure afin de produire directement les métabolites toxiques de la CPA. Une étude a été effectuée en exploitant le potentiel métabolique intrinsèque de la levure (Kelly and Parry 1983) et une autre utilisait une souche produisant le CYP2B1 (Black, Ellard et al. 1989). Dans les deux cas, les souches exposées à la CPA seule présentaient une augmentation de la fréquence de mutations ou une aneuploidie.

Or, contrairement aux cellules eucaryotes et à certaines souches de levures telles que KY118, D6 ou JD1 (Kelly and Parry 1983 ; Black, Ellard et al. 1989), utilisées pour détecter des phénomènes de mutations ou de recombinaisons mitotiques, où l'activation intracellulaire de la CPA conduit à une importante génotoxicité (Anderson, Bishop et al. 1995), nos levures ne semblent pas touchées par ce phénomène. Dans notre cas, la production du CYP2B6 dans la souche de *S.cerevisiae* W303 et le traitement de celle-ci par de fortes concentrations de CPA, dans différentes conditions de culture et de traitement, ne conduit pas à des effets visibles sur la viabilité de la levure.

L'activité du CYP2B6 dans la levure a alors été évaluée afin de déterminer si celle-ci pouvait être à l'origine de la résistance de la souche W303. En effet, une mauvaise expression ou activité du CYP2B6, présentant de plus une faible affinité naturelle dans la levure, peut entraîner une production trop faible de métabolites toxiques, entraînant l'apparente innocuité de la CPA pour W303. Or la mise au point d'un protocole de détection par CLHP-SM du métabolite primaire de la CPA nous a permis de déterminer la fonctionnalité des CYPs 2B11 et 2B6 dans W303.

Une possibilité d'explication serait la nécessité de la présence d'un enzyme spécifique pour transformer le métabolite hydroxylé en produit alkylant final. En effet, ni la moutarde phosphoramide ni l'acroléine n'ont été détectés en utilisant la CLHP-SM lors de la bioconversion de la CPA dans W303. Cette enzyme serait présente dans les cultures cellulaires de mammifère, expliquant la toxicité de la CPA dans les tests utilisant ces systèmes. Quant aux différences observées entre les levures, toutes les souches de *S.cerevisiae* présentant une génotoxicité lorsqu'elles étaient traitées avec la CPA étaient des souches diploïdes (Kelly and Parry 1983; Black, Ellard et al. 1989; Albertini 1991; Monaco, Dominici et al. 1992). Or la souche de W303 que nous avons utilisée est haploïde et ne peut présenter les évènements génétiques observées dans les autres souches, notamment les conversions géniques et recombinaisons mitotiques.

Une autre différence entre les levures et les cellules eucaryotes est la quantité et l'efficacité des pompes d'efflux présentes au niveau de la membrane plasmique. Ces transporteurs réduisent l'efficacité des drogues géno ou cytotoxiques (Srikanth, Chakraborti et al. 2005) en rejetant hors de la cellule les drogues ou les métabolites actifs produits par la levure.

Ceci expliquerait la présence du métabolite hydroxylé 4-OHCPA dans le milieu de culture, les conditions physico-chimiques de cette solution ne lui permettant pas de se décomposer en métabolite toxiques. Or, l'activité de ces pompes dépend en partie de leur environnement en stérols membranaires (Hemenway and Heitman 1996). Des souches de levures "humanisées", produisant du cholestérol à la place de l'ergostérol et présentant une inhibition de ces pompes, pourraient donc être utilisées dans le cadre de l'amélioration de la toxicité de la CPA sur la levure.

Une dernière hypothèse pour expliquer la faible toxicité de la CPA est que, son effet étant principalement génotoxique, les systèmes de réparation de l'ADN de la souche W303 soient déclenchés assez rapidement et de façon assez efficace pour permettre une résistance à la toxicité de la prodrogue. Si ceci était le cas, alors un système rapporteur de génotoxicité dans la levure, utilisant l'expression d'un gène de réparation de l'ADN comme mesure de l'effet de la CPA se révèlerait informatif sur l'efficacité du P450 exprimé dans la levure qui active la prodrogue.

6.4.2. Systèmes rapporteurs pour l'évaluation de l'activité des variants chimériques de P450

6.4.2.1. S.cerevisiae

Le fait que notre système rapporteur se soit révélé inefficace pour l'identification de la génotoxicité, directe ou indirecte, de deux produits, pourrait être du à deux facteurs.

Le faible nombre de copies du plasmide pourrait ne pas permettre l'expression d'une quantité suffisante de GFP afin que sa fluorescence puisse être détectée sur des cellules entières, ce qui avait été le cas lors de l'intégration du même système rapporteur dans le génome de la levure (Walmsley, Billinton et al. 1997).

Une autre hypothèse serait une activité des pompes d'efflux diminuant le signal fluorescent via le rejet du substrat et des produits toxiques hors de la cellule. Une amélioration du signal avait en effet été observée en utilisant le même système rapporteur que le nôtre transformé dans une souche de levure déplétée pour l'expression de certaines pompes d'efflux et traitée par divers agents génotoxiques (Lichtenberg-Frate, Schmitt et al. 2003).

6.4.2.2. C.elegans

Le fait qu'un mélange de CPA et de son métabolite hydroxylé induise une diminution de ponte chez le nématode peut être du à différents facteurs, notamment de cytotoxicité au niveau des œufs. Un autre facteur connu de baisse de la fertilité est que les adultes peuvent effectuer de la rétention d'œufs s'ils détectent un environnement hostile pour le développement des embryons (Waggoner, Zhou et al. 1998).

L'absence de ce même effet lors du traitement des vers par le mafosfamide seul peut quant à elle indiquer une mauvaise pénétration du métabolite hydroxylé dans les cellules ou encore un métabolisme endogène de la CPA par le nématode, générant des métabolites différents de

ceux observés dans les lignées de cellules eucaryotes ou la levure. En effet, *C.elegans* possède environ 80 gènes de P450 (Menzel, Bogaert et al. 2001) impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques (Menzel, Bogaert et al. 2001).

6.5. Conclusions

Malgré son effet toxique important dans l'organisme humain et sur certaines lignées de cellules eucaryotes de mammifères, la CPA présente une toxicité plus faible sur *S.cerevisiae* exprimant des P450s recombinants. Ceci ne permet donc pas d'utiliser cet organisme tel quel comme crible pour l'évaluation de l'activité CPA hydroxylase de P450s mutés. Le statut de prodrogue de la CPA, nécessitant deux réactions afin d'être activée, le nombre de métabolites alternatifs non toxiques pouvant être générés et la faible affinité des P450s le métabolisant peuvent expliquer ceci.

Parallèlement, de nombreux facteurs spécifiques à *C.elegans*, autre système de tri choisi dans le cadre de cette thèse, induisent une impossibilité d'utiliser cet eucaryote inférieur comme crible. Ces deux organismes semblait pourtant relativement adéquats, la levure étant en plus capable d'exprimer correctement les P450s 2B6 et 2B11 responsables de l'activité de la CPA chez l'humain et le chien, et donc aussi les chimères ou mutants issus des gènes de ces enzymes.

L'essai de mise au point, dans S.cerevisiae et C.elegans, d'un crible de génotoxicité pour évaluer l'efficacité de métabolisation de la CPA par des variants de P450, s'est heurté dans un cas à un manque de toxicité de la CPA et dans un autre cas à un problème de métabolisation de la prodrogue. Des améliorations devront être apportées au système rapporteur actuel réalisé dans S.cerevisiae afin de pouvoir trier rapidement un grand nombre de mutants de P450 pour identifier ceux qui seraient optimisés pour la métabolisation de la CPA.

7. Conclusions générales et perspectives

Dans le domaine de la santé; notamment depuis les premiers essais de thérapie génique, l'idée d'utiliser du matériel biologique en tant que principe actif de certains traitements est largement répandue. Appliquée à la recherche de thérapies pour le cancer, problème de santé public associé au vieillissement de la population, cette idée a permis le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques, parfois en association avec certaines molécules synthétiques.

La "thérapie génique dirigée par le gène" (GDEPT) associant l'administration de la CPA, prodrogue cytotoxique anticancéreuse, à l'introduction dans les cellules tumorales du gène humain de l'enzyme métabolisant cette prodrogue, le CYP2B6, a été développée dans ce cadre de recherche. Les essais *in vitro* et cliniques réalisés ayant montré une certaine amélioration de la thérapie mais la persistance de certains effets secondaires, en partie dus au fait que le CYP2B6 présente une faible efficacité pour la CPA, il a été postulé que la construction d'un P450 optimisé pour la transformation de la CPA permettrait d'améliorer cette thérapie.

En parallèle, l'utilisation de méthodes semi rationnelles de construction de banques de variants permet une approche globale de l'étude structurale et l'exploration de l'ensemble de la séquence d'une protéine. Ceci peut faciliter l'identification de modules structuraux importants impliqués dans l'activité d'une protéine. Le résultat de l'analyse des zones critiques pour l'activité permet ensuite le dessin intelligent de protéines optimisées pour la fonction étudiée.

Un approche de ce type a donc été utilisée pour la construction du P450 optimisé, devant posséder la meilleure affinité possible pour la CPA, tout en conservant une séquence et une architecture protéique la plus proche possible de celles de l'enzyme humain afin d'éviter toute réaction immunologique lors de l'introduction du gène dans l'organisme.

7.1. Méthode de chimérogenèse

La construction de la banque combinatoire ordonnée de chimères a été effectuée en utilisant le CYP2B11 canin, possédant une affinité élevée pour la CPA, et l'enzyme humain.

La majorité des méthodes de chimérogenèse introduit des biais de recombinaison et une certaine proportion de contamination parentale (Coco, Levinson et al. 2001 ; Sieber, Martinez et al. 2001; Abecassis, Pompon et al. 2003).

Nous nous sommes orientés vers une approche semi-rationnelle de création de variants, permettant d'explorer la totalité de la séquence, tout en gardant un nombre de variants compatible avec les méthodes d'analyse fonctionnelle.

Une banque combinatoire ordonnée de chimères, à points de jonction définis, a donc été dessinée afin de pouvoir déterminer précisément les régions impliquées dans la meilleure affinité du CYP2B11 pour la CPA par rapport au CYP2B6. Or, les quelques méthodes existant pour construire des banques combinatoires ordonnées apparaissent difficiles à mettre en œuvre dans ce cadre (Hiraga and Arnold 2003; Meyer, Silberg et al. 2003).

Une méthode de chimérogenèse, SIGNAL, a donc été développée. Cette technique est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides chimériques qui permet la création de banques combinatoires ordonnées entre des séquences de faibles homologies. Ces oligonucléotides permettent de forcer la recombinaison au niveau des zones les moins homologues et de choisir de façon précise n'importe quel point de recombinaison au sein de la séquence (Jezequel, Loeper et al. 2008).

SIGNAL nécessite encore quelques améliorations et une validation de son protocole avec d'autres jeux de formes parentales, plus ou moins homologues, mais le test de construction de séquences mosaïques de CYPs 2B11 et 2B6 s'est révélé concluant. Dans notre cas, les points de recombinaison des chimères ont été choisis en fonction de connaissances structurales, dans des zones homologues, et en se basant sur le fait que le taux de protéines actives est fortement augmenté par les méthodes conservant la structure tridimensionnelle (Voigt, Martinez et al. 2002).

Un autre moyen de définir les points de jonction est d'utiliser l'algorithme SCHEMA, qui a été développé afin de déterminer les points de recombinaison les moins susceptibles d'altérer la structure d'une manière conduisant à un enzyme inactif. SIGNAL pourrait être une méthode simple à utiliser pour la construction des chimères définies par SCHEMA.

Les méthodes récentes de génomique structurale ont permis de mettre en évidence que de nombreuses séquences protéiques diverses peuvent générer des motifs structuraux proches. Ceci a remis en cause l'étude des relations séquence-fonction, qui peuvent en fait être considérées comme des relations structure-fonction au sens propre. Dans ce cadre, les techniques d'échange ciblé de modules structuraux sont intéressantes pour l'étude des enzymes de séquences éloignées possédant des substrats communs

7.2. Relations structure-fonction

L'analyse de l'activité CPA hydroxylase des variants de la banque combinatoire ordonnée a montré que seulement 3 sur 15 (20%) des chimères générées étaient inactives vis-à-vis du substrat d'intérêt. Une certaine diversité fonctionnelle des chimères a également été obtenue, permettant de formuler des hypothèses sur les relations structure-fonction au sein des CYPs 2B11 et 2B6 avec un faible nombre de mutants.

En effet, certains des 15 fragments de la séquence (de A à O) du CYP2B6, introduits un par un dans la séquence du CYP2B11, ont induit un changement des caractères enzymatiques de l'activité CPA hydroxylase des chimères par rapport aux enzymes parentaux.

L'échange des modules structuraux entre CYPs 2B11 et 2B6 a généré des chimères comportant plusieurs substitutions. Même s'il n'est pas possible de déterminer par cette approche l'implication de résidus uniques, l'incorporation des données de la littérature permet de formuler des hypothèses plus précises sur le rôle potentiel de certains acides aminés dans l'activité CPA hydroxylase des CYPs 2B11 et 2B6.

En parallèle, cette analyse fonctionnelle a également permis de formuler l'hypothèse que les fragments dont la substitution présentait les effets les plus importants sur la constante de Michaëlis des chimères envers la CPA semblaient être situés en dehors du site actif, notamment au niveau des canaux d'entrée et de sortie du P450. Ces résultats se démarquent de ceux de la littérature, désignant habituellement les résidus constituant le site actif comme étant les plus critiques pour la modulation de l'affinité.

Or les P450s sont des enzymes à mécanisme complexe, avec un cycle catalytique comprenant de nombreuses étapes. Il est en fait plus prudent de considérer le K_m comme une constante de demi-saturation.

Malgré le fait que le concept de canaux d'accès au site actif soit maintenant couramment accepté, il serait possible que leur rôle réel ait été fortement surestimé. La dynamique d'une structure protéique aussi flexible que celle des P450s pourrait être capable de générer de multiples voies d'accès au site actif dans la structure au cours de son mouvement. Une autre possibilité serait que les substitutions réalisées modifient indirectement la conformation du site actif. Dans le cas où la constante catalytique est très inférieure à la constante de vitesse d'association enzyme-substrat, la modification de l'accès au site actif d'un canal devrait affecter de manière comparable l'entrée et la sortie du substrat et, de ce fait, ne pas avoir d'impact majeur sur l'affinité de l'enzyme.

Même s'il a été postulé que le K_m équivalait à K_s, il serait nécessaire de valider cette hypothèse en évaluant directement la constante de dissociation de la CPA. Ceci pourrait être réalisé par la mesure du changement spectral induit par la fixation de la CPA. De manière plus complémentaire, des expériences de cinétique rapide mettant en compétition la CPA avec un autre substrat fluorescent pourraient permettre d'évaluer plus précisément ces constantes de vitesse.

L'ensemble des observations faites sur les résidus contrôlant l'affinité mériteraient d'être vérifiées avec plusieurs autres substrats afin de déterminer si l'effet global observé est spécifique à la CPA. Ceci n'est pas un point critique dans les applications étudiées mais il serait préférable que l'enzyme optimisé n'induise pas de métabolismes supplémentaires induisant des effets secondaires.

Ayant défini lors de cette première étape la cartographie des modules structuraux impliqués dans l'affinité de la CPA pour le CYP2B11, il serait judicieux de mettre en œuvre ces informations pour construire le P450 optimisé dans un contexte CYP2B6. Même si la technique d'échange de segments utilisée reste la même, la stratégie est ici complémentaire. Il s'agit en effet de procéder de manière additive, en vérifiant que l'introduction dans le CYP2B6 des modules identifiés comme critiques dans le CYP2B11 se comporte comme coopérative.

Après avoir défini les combinaisons optimales, il serait intéressant de définir plus précisément par mutagenèse dirigée ponctuelle, quels résidus au sein des fragments échangés sont critiques. Cette analyse par mutagenèse dirigée peut être réalisée de manière soustractive, en remplaçant des résidus canins par des humains. En effet, il serait avantageux, pour réduire

l'immunogénicité lors de l'introduction d'une telle molécule chez l'Homme, de conserver les résidus de type 2B6 ne présentant pas d'avantages à être substitués par leurs équivalents du CYP2B11, s'ils n'influent pas sur l'activité. Les résidus situés en surface ou possédant une charge sont les plus susceptibles de déclencher des réactions immunitaires. Plusieurs logiciels permettent de prédire l'éventuelle immunogénicité d'une protéine thérapeutique (Tong, Tan et al. 2007).

Enfin, l'ensemble de la séquence pourrait être soumise à une dernière étape de mutagenèse aléatoire afin de raffiner l'optimisation de l'enzyme. A la fin de cette dernière phase, plusieurs enzymes optimisés seront retenus. Le choix de final se fera en fonction du rapport activité/immunogénicité.

7.3. Gène rapporteur/crible à haut débit

La prodrogue CPA étant transformée en métabolites génotoxiques par les P450s, nous avions imaginé de réaliser un crible basé sur cette génotoxicité induite par les variants de la banque.

Nos essais de mise au point de systèmes rapporteurs, chez *C.elegans* et *S.cerevisiae*, n'ont pas été concluants, malgré le fait que la levure soit un organisme efficace pour la production des P450s (Pompon, Louerat et al. 1996) et pour son utilisation dans certains tests de génotoxicité impliquant le gène rapporteur de la GFP (Cahill, Knight et al. 2004).

Le manque de sensibilité du crible pourrait être lié à des problèmes de pénétration de la CPA à l'intérieur des cellules. En effet, la valeur de demi-saturation de l'activité CPA hydroxylase sur cellules entières est beaucoup plus élevée que celle mesurée avec des microsomes. Ceci suggère un effet de barrière induit par la paroi des levures. De plus, le substrat comme son métabolite peuvent être pris en charge par des pompes d'efflux particulièrement efficaces de ce microorganisme.

Il serait intéressant de mesurer la concentration intracellulaire de la CPA dans les levures et dans des cellules cancéreuses, afin de relever une éventuelle différence. Si ceci était avéré, un moyen de réduire le phénomène serait l'utilisation d'une souche de levure "humanisée" au niveau de ses stérols membranaires. En effet, la substitution de l'ergostérol par un autre stérol est connue pour induire une inhibition des pompes d'efflux. L'utilisation de levures inactivées pour ces pompes a montré une augmentation de la sensibilité de détection de produits génotoxiques (Lichtenberg-Frate, Schmitt et al. 2003).

Un autre problème potentiel est lié à la décomposition du métabolite primaire de la CPA en métabolites actifs. En effet, ce processus est dépendant du pH, et donc potentiellement de structures subcellulaires comme les lysosomes. Par ailleurs, l'implication d'activités annexes de type estérase ne peut être exclue. Or, ces deux caractéristiques peuvent différer entre la levure et les cellules animales. Dans le cas où ces mécanismes seraient démontrés, il pourrait s'avérer nécessaire de développer d'autres modèles de crible basés sur des cellules animales en culture.

Annexes

8. Annexe I : Matériel et Méthodes

8.1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET PLASMIDES 193

8.1.1. Souches *193*

8.1.2. Plasmides *193*

8.2. BIOLOGIE MOLECULAIRE 194

8.2.1. Méthode enzymatique de génération des chimères *194*

8.2.2. Méthode SIGNAL de génération de chimères *195*

8.2.3. Clonage de l'ADN des chimères dans pYeDP1-8-2 (pV8) *195*

8.2.4. Transformation des levures *196*

8.2.5. Construction du plasmide contenant le gène rapporteur RAD54 ..... *197*

8.3. MESURE DE L'ACTIVITE 4-OH CPA HYDROXYLASE 198

8.3.1. Réalisation *198*

8.3.2. Analyse chromatographique *200*

8.4. EFFET DE LA CYCLOPHOSPHAMIDE (CPA) SUR S.CEREVISIAE 201

8.4.1. Test de croissance en gouttes *201*

8.4.2. Test de viabilité et aptitude à la respiration *202*

8.4.3. Test de croissance en milieu liquide *202*

8.4.4. Test du système rapporteur dans S.cerevisiae *202*

8.5. CAENORHABDITIS ELEGANS 203

8.5.1. Utilisation du surnageant de levure *203*

8.5.2. Utilisation du mafosfamide *204*

8.1. Matériel biologique et plasmides

8.1.1. Souches

Les souches de bactéries (*E.coli*) utilisées sont de type TOP10 et DH5αF'IQ (Invitrogen).

Les souches de levure *S.cerevisiae* utilisées (incubées à 28°C) sont :

- **W(N) ou W303-1B** : *MATα, ade2–1, trp1–1, leu2–3,112, his3–11, 15, ura3–1*. Cette souche exprime la P450 réductase (CPR) et le cytochrome b5 endogène de levure.
- **W(R)** : *MATα, ade2–1, trp1–1, leu2–3,112, his3–11, 15, ura3–1; CPR*::*(ura3-GAL10-CYC1-ORF CPR)* Cette souche dérive de W303-1B et surexprime le gène de la P450 réductase endogène de levure (CPR) sous le contrôle du promoteur inductible par le galactose GAL10-CYC1 (Truan, Cullin et al. 1993)
- **W(R)V60 :** W(R) transformée par pYeDP60.
- **W(R)2B6 (Gervot, Rochat et al. 1999) :** W(R) transformée avec le vecteur d'expression pYeDP60 (Urban, Cullin et al. 1990) contenant l'ADNc du CYP2B6 (Pompon, Louerat et al. 1996), flanqué d'une partie du promoteur de l'iso-1-cytochrome c (CYC1) de *S.cerevisiae* en 5' et d'une partie du terminateur de la 3-phosphoglycerate kinase (PGK) de *S.cerevisiae* permettant l'expression inductible du CYP2B6 dans la levure et la surexpression de la P450 réductase endogène de levure sous contrôle du galactose.
- **W(R)2B11 :** W(R) transformée avec le vecteur d'expression pYeDP60 contenant le gène synthétique codant pour le CYP2B11, décrit dans l'Annexe I. De même que pour W(R)2B6, cette souche permet l'expression d'un CYP2B11 fonctionnel.
- **W(R)1A1** : W(R) transformée par le vecteur d'expression pYeDP1-8-2 contenant l'ADNc du CYP1A1, permettant également son expression et sa fonctionnalité (Taly, Urban et al. 2007).

Les levures peuvent être cultivées soit en milieu riche glucosé (YPG), galactosé (YPGal), avec de l'éthanol (YPGE) soit en milieu minimum synthétique glucosé (SW10) ou galactosé (SW5), les auxotrophies de chaque souche étant alors complémentées par les bases (A=adénine, B=uracile) ou les acides aminés adéquats. La croissance en SW10 inhibe la production de P450 recombinants inclus dans un vecteur de type pYeDP, alors que la croissance en SW5 induit cette expression.

8.1.2. Plasmides

Les plasmides utilisés sont :

- **Vecteurs commerciaux** : pPCR Script (Stratagène) et pCR2.1-TOPO (Invitrogen)
- **pYeDP60 ou pV60 et pYeDP1-8-2 ou pV8** (Pompon, Louerat et al. 1996)
- **pAM1** (Figure 87): vecteur navette réplicatif de levure construit au laboratoire. Il contient deux origines de réplication, une d'*E.coli* et une de levure de type ARS, associé à une

séquence centromérique. Ces vecteurs sont nommés ARS-CEN et sont présents dans la levure à la hauteur d'une seule copie. pAM1 comporte également deux marqueurs de sélection : le gène de résistance à l'ampicilline pour la bactérie et ADE2 pour la levure.

- **pKT127** : plasmide commercialisé par EUROSCARF (http://web.uni-frankfurt.de/fb15 /mikro/euroscarf/) et contenant l'ADNc codant pour la YeGFP, une Green Fluorescent Protein dont la séquence a été mutée pour une meilleur expression dans la levure. Ce plasmide contient également deux autres gènes de résistance aux antibiotiques : un pour la kanamycine, l'autre pour l'ampicilline.
- **p2B6/M13d et p2B6/M13i** : issus du clonage de la phase ouverte de lecture du CYP2B6 dans le plasmide pM13mp19 (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Cette dernière a été extraite du plasmide PYeDP60/2B6 (Gervot, Rochat et al. 1999) puis clonée dans pM13mp19 en utilisant l'enzyme *Bam*HI. Les deux constructions contenant la phase ouverte de lecture du CYP2B6 sur le brin positif (p2B6/M13d) ou négatif (p2B6/M13i) du plasmide final ont été conservées.
- **pPCRScript/2B11** : plasmide comportant le gène synthétique codant pour le CYP2B11 (GenBank n°EU736326), cloné par Genecust dans le plasmide commercial pPCRScript (Stratagène), au niveau du site *Srf*I, selon le protocole du fabricant.

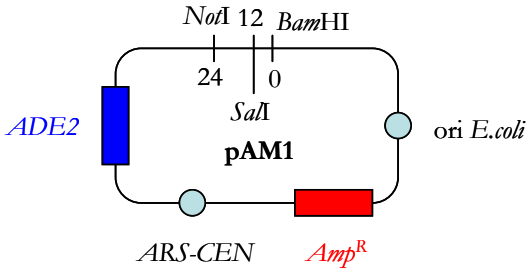


Figure 87. Schéma des phases ouvertes de lecture et positions des sites de restriction contenus dans le vecteur pAM1.

8.2. Biologie moléculaire

Les enzymes de restriction et de modification ont été utilisées selon les protocoles préconisés par le fabricant, New England Biolabs. Les ADN polymérases utilisées selon les protocoles de leurs fabricants respectifs sont une *Taq* polymérase (QBiogen), le kit "Système de PCR haute fidélité Expand" appelé Expand (Roche), le kit "ADN Polymérase *Taq* Platinum" appelé Platinum (Invitrogen) et la DyNAzyme ™ EXT (Finnzymes).

8.2.1. Méthode enzymatique de génération des chimères

Trois ADN polymérases ont été utilisées pour ces expériences: soit une *Taq* polymérase simple en tant que témoin possédant une vitesse d'élongation relativement élevée et pas d'activité exonucléasique correctrice de 3' vers 5', soit 2 mélanges de Taq avec des polymérases possédant une activité correctrice, celle de *P.woesei* pour Expand et celle de *P.*GB-D pour Platinum.

Après avoir digéré la matrice pPCRScript/2B11 afin d'extraire la phase ouverte de lecture du CYP2B11 du plasmide et de générer les mégas oligos (Figure 46.1), une élongation (Figure 46.2) contenant un mélange de matrice simple brin p2B6/M13d ou i et un ou deux méga-oligos est réalisée avec une ADN polymérase. Des échantillons témoins ont également été réalisés en effectuant l'élongation en absence de méga-oligos.
Un mélange des deux élongations effectuées avec le plasmide p2B6/M13d et p2B6/M13i est réalisé et amplifié avec les oligos pCYC (CCTTATACATTAGGTCCTTTGTAGC) et tPGK (CTGGCAATTCCTTACCTTCC), correspondant aux oligos 1 et 2 de la Figure 46.4. Tous les composants nécessaires sont ajoutés, sauf la polymérase. Ce mélange est chauffé pour dénaturer puis hybrider les matrices (Figure 46.3) puis l'enzyme est alors ajoutée. Un cycle d'élongation suivi de 25 cycles normaux d'amplification est effectué.

Les produits de PCR chimériques sont clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO du kit TOPO-TA Cloning. Après détection des clones contenant l'insert, par restriction, l'ADN de ces derniers est envoyé à séquencer (GATC Biotech).

8.2.2. Méthode SIGNAL de génération de chimères

Protocole décrit dans l'article joint (Jezequel, Loeper et al. 2008). Les quelques mutations ponctuelles ayant été introduites dans les séquences des chimères lors de la réalisation de la méthode SIGNAL ont été corrigées avec le kit Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagène) puis les ORFs ont été clonées dans le plasmide pYeDP1-8-2

8.2.3. Clonage de l'ADN des chimères dans pYeDP1-8-2 (pV8)

Chaque chimère, construite par la méthode SIGNAL décrite dans l'article, porte le nom, de A à O, du fragment de CYP2B6 inséré dans l'architecture du CYP2B11 (Figure 92). Ces chimères ont premièrement été clonées dans pV8 par la méthode de clonage indépendant de la ligation (LIC).

Calibration de la digestion du vecteur pV8 digéré BamHI/EcoRI par l'exonucléase III :
La digestion de pV8 par *Bam*HI et *Eco*RI génère un ADN linéaire présentant une séquence régulatrice homologue aux séquences communes des chimères à chaque extrémité (Figure 88). La digestion par ces deux enzymes laisse deux extrémités 5' protubérantes qui peuvent être digérées par l'exonucléase III.

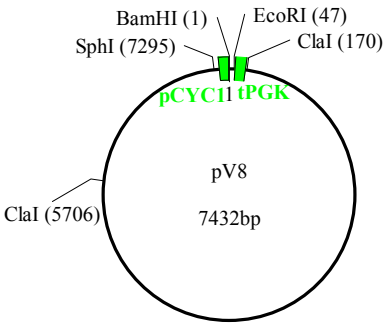


Figure 88. Positions de certains sites de restriction enzymatique sur le plasmide pV8. Certains sites enzymatiques présents ainsi que leurs positions sont indiqués. Les séquences régulatrices promotrice (pCYC1) et terminatrice (tPGK) homologues à celles présentes dans les chimères générées sont représentées en vert.

Afin de déterminer la vitesse de digestion des extrémités par l'exonucléase III, pV8 linéarisé est digéré par l'exonucléase III pendant différents intervalles de temps. Ce plasmide est ensuite incubé avec de la nucléase de haricot Mung, qui digère l'ADN simple brin, créant des bouts francs. L'ADN est ensuite recircularisé par ligation, transformé dans *E.coli*, extrait des clones bactériens puis digéré par *Cla*I et *Sph*I. Les sites de ces enzymes sont situés aux environs de l'extrémité de la zone d'homologie entre l'insert et le vecteur (Figure 88), et choisis comme témoins de digestion de la matrice par l'exonucléase III, permettant de déterminer que les clones dont le plasmide linéarisé pV8 a été digéré 1 min par l'exonucléase III sont adéquats.

Calibration de la digestion des chimères par l'exonucléase III: Au cours de cette calibration, une partie d'une solution stock du plasmide V8 digéré 1 min par l'exonucléase III est mélangée avec le produit d'amplification d'une chimère, digérée pendant différents intervalles de temps avec la même enzyme. Les différentes constructions issues de ce mélange sont transformées dans la bactérie et l'ADN des clones obtenus est extrait puis digéré par *Kpn*I, présentant un site unique dans les séquences des chimères, indiquant qu'une digestion de la chimère I pendant 40 s avec l'exonucléase engendre la plus grande proportion d'ADN de clones présentant la taille attendue.

Clonage des chimères par LIC : Le mélange de chaque chimère et de pV8 digérée par l'exonucléase III est incubé 2h à température ambiante puis transformé dans des cellules TOP 10 chimiocompétentes. .Les clones contenant l'insert, détectés par restriction, sont ensuite envoyés au séquençage (GATC Biotech)

Après ce premier clonage, un second a été effectué par Gap Repair dans la levure par co-transformation des séquences chimériques avec le vecteur pV8 digéré.

8.2.4. Transformation des levures

Que ce soit pour effectuer un gap repair ou transformer les chimères clonées dans pV8, la méthode utilisé pour transformer les levures est issu du protocole décrit par Urban et coll. (Urban, Mignotte et al. 1997). Brièvement, une préculture d'une nuit est effectuée en YPGA (pour la souche W(N)) ou SW10 (pour la souche W(R)). Cette préculture est diluée à une densité cellulaire d'environ 2.10^6 cellules/mL dans du YPGA. Lorsque la densité cellulaire atteint 2.10^7 cellules/mL, la culture est centrifugée. Le culot est lavé successivement à l'eau stérile et avec un tampon lithium fraîchement préparé (acétate de lithium 100 mM/Tris-HCl 10 mM pH 7,5/EDTA 1mM). Les cellules sont reprises dans du tampon lithium et 100 µL de cellules sont prélevés puis mélangés avec environ 1 µg d'ADN transformant et 1 µg d'ADN transporteur (ADN de sperme de hareng). Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min puis 250 µL de polyethylèneglycol (PEG) 4000 Fluka 50 % (w/v) sont ajoutés. Ce mélange est incubé sous agitation douce pendant 30 min à 28 °C.

Ensuite, un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 5 min. Les cellules sont rincées deux fois à l'eau distillée stérile puis reprises dans 100 µL de Ringer et étalées sur un milieu solide sélectif. La culture est incubée 3 jours à 28°C.

8.2.5. Construction du plasmide contenant le gène rapporteur RAD54

Amplification du promoteur de RAD54 :

La séquence promotrice de RAD54 est amplifiée avec de la DyNAzyme ™ EXT à partir de l'ADN génomique de W(N), extrait d'une culture en YPGA (Hoffman and Winston 1987). La séquence promotrice est modifiée par l'ajout d'un site de restriction à chacune de ses extrémités grâce à 2 amorces Eurogentec (la partie soulignée correspond au site de restriction de l'enzyme indiqué en bout de séquence) :

- 5' CCGTGGATCCGGTGCGTGGTTCCAGCTTCATGTGC 3' (*Bam*HI)
- 5'CGGTGTCGACGGTACCTTGAAATAGAGCTAAGTTCTGAGCGTTTG3' (*Sal*I)

Le cycle utilisé était de 2 min à 94°C suivi de 32 cycles d'une min à 94°C, de 30 secondes à 60°C et d'1 min à 72°C. Le programme était achevé par 10 min à 72°C. L'ADN de la bande d'intérêt issu du dépôt de la PCR sur un gel d'agarose (Amersham) à 0,8% est purifié (Sambrook, Fritsch et al. 1989), puis cloné dans pPCRScript.

Clonage :

L'ADN de pAM1 (vecteur) et du promoteur RAD54 dans pPCR Script (insert) est digéré par *Bam*HI et *Sal*I. Après purification sur gel de chacun des éléments d'intérêt, ils sont assemblés par une ligation et transformés dans la souche DH5α d'E.coli. L'ADN des clones de bactérie est extrait et la présence de l'insert est vérifiée par une digestion par *Bam*HI. L'ADN d'un clone correct est digéré par *Not*I et *Sal*I. En parallèle le plasmide pKT127 est digéré par les mêmes enzymes. Une fois les deux éléments purifiés sur gel, ils sont assemblés par ligation. Celle-ci est transformée dans DH5α, la construction est vérifiée grâce à une restriction par *Nde*I effectuée sur l'ADN extrait de quelques clones qui est ensuite envoyé à séquencer (GATC Biotech).

Le plasmide complet est ensuite transformé dans *S.cerevisiae* W(R) et dans W(R)1A1, créant les souches nommées W(R)pLCJ et W(R)pLCJ 1A1, respectivement.

8.3. Mesure de l'activité 4-OH CPA hydroxylase

8.3.1. Réalisation

Bioconversion en levures entières : des cellules des souches W(R)V60, W(R)2B11 et W(R)2B6 sont cultivées en milieu liquide induisant l'expression de protéines recombinantes (Pompon, Louerat et al. 1996) puis traitées avec des concentrations finales de CPA de 0 à 25 mM, diluées dans l'éthanol. Des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers, centrifugés pendant 5 minutes à 6000g puis les surnageants dilués au ½ avec de l'acétonitrile sont analysés directement en CLHP-SM après passage d'une solution témoin de substrat seul. Parallèlement, la densité optique des prélèvements est mesurée afin d'estimer leur concentration cellulaire.

Cinétique de bioconversion **:** des cellules de la souche W(R)2B6 sont cultivées en milieu liquide induisant l'expression du CYP2B6 (Pompon, Louerat et al. 1996). Les cellules sont traitées avec de la CPA diluée dans l'éthanol (concentration finale 10 mM), des prélèvements de 1 mL sont effectués à intervalles réguliers, centrifugé pendant 5 minutes à 6000 g puis les surnageant dilués au ½ dans l'acétonitrile sont analysés directement par CLHP-SM.

Chimères : La préparation de microsomes de W(R) exprimant les P450s parentaux et chimériques et surexprimant la P450 réductase de levure a été effectuée comme décrit précédemment (Pompon, Louerat et al. 1996). La concentration de P450 dans les microsomes a été déterminé spectralement selon la méthode d'Omura et Sato (Omura and Sato 1964). La concentration en protéine totale des microsomes a été déterminée en utilisant un test à l'acide bicinchoninique (Pierce). Tous les pipetages réalisés dans cette partie ont été effectués par un robot Qiagen Bio Robot 8000. Les tests activités sont réalisées en plaque 96 puits, dont la disposition est décrite en Figure 89. Une plaque permet de tester l'activité de deux enzymes différentes ainsi que l'activité de W(R)V60, témoin négatif, et de W(R)2B11, choisi comme témoin positif en raison de sa forte affinité pour la CPA.

Dans un puits d'une plaque 96 puits et dans un volume total de 50 µL, différentes quantités de microsomes sont mélangés avec 1µL de CPA diluée dans l'éthanol à une concentration finale de 0,05–0,1–0,25-0,5-1-2,5-5 ou 10 mM dans un tampon sodium phosphate 100 mM pH 7.4, 1 mM EDTA. La réaction a été démarrée par l'ajout de 50µL de NADPH à 1mg/mL puis arrêtée à 5, 10, 20 et 30 minutes par l'ajout d'un mélange de 48,5 µL d'acétonitrile à 50% et 1,5 µL d'acide coumarique à 10 mM dilué dans l'éthanol. Toutes les incubations sont réalisées à 30°C.

	0	5	10	20	30	0	5	10	20	30	30	30
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Enz 1 0,05	Enz 1 0,05	Enz 1 0,05	Enz 1 0,05	Enz 1 0,05	Enz 2 0,05	Enz 2 0,05	Enz 2 0,05	Enz 2 0,05	Enz 2 0,05	Témoin négatif 0,05	Témoin positif 0,05
B	Enz 1 0,1	Enz 1 0,1	Enz 1 0,1	Enz 1 0,1	Enz 1 0,1	Enz 2 0,1	Enz 2 0,1	Enz 2 0,1	Enz 2 0,1	Enz 2 0,1	Témoin négatif 0,1	Témoin positif 0,1
C	Enz 1 0,25	Enz 1 0,25	Enz 1 0,25	Enz 1 0,25	Enz 1 0,25	Enz 2 0,25	Enz 2 0,25	Enz 2 0,25	Enz 2 0,25	Enz 2 0,25	Témoin négatif 0,25	Témoin positif 0,25
D	Enz 1 0,5	Enz 1 0,5	Enz 1 0,5	Enz 1 0,5	Enz 1 0,5	Enz 2 0,5	Enz 2 0,5	Enz 2 0,5	Enz 2 0,5	Enz 2 0,5	Témoin négatif 0,5	Témoin positif 0,5
E	Enz 1 1	Enz 1 1	Enz 1 1	Enz 1 1	Enz 1 1	Enz 2 1	Enz 2 1	Enz 2 1	Enz 2 1	Enz 2 1	Témoin négatif 1	Témoin positif 1
F	Enz 1 2,5	Enz 1 2,5	Enz 1 2,5	Enz 1 2,5	Enz 1 2,5	Enz 2 2,5	Enz 2 2,5	Enz 2 2,5	Enz 2 2,5	Enz 2 2,5	Témoin négatif 2,5	Témoin positif 2,5
G	Enz 1 5	Enz 1 5	Enz 1 5	Enz 1 5	Enz 1 5	Enz 2 5	Enz 2 5	Enz 2 5	Enz 2 5	Enz 2 5	Témoin négatif 5	Témoin positif 5
H	Enz 1 10	Enz 1 10	Enz 1 10	Enz 1 10	Enz 1 10	Enz 2 10	Enz 2 10	Enz 2 10	Enz 2 10	Enz 2 10	Témoin négatif 10	Témoin positif 10

Figure 89. Disposition de la plaque 96 puits utilisée pour la mesure de l'activité CPA hydroxylase des P450s parentaux et chimériques. Le chiffre indiqué en rouge en haut indique le temps d'incubation des puits de la colonne correspondante avec la CPA. Enz=enzyme, le chiffre présent dans chaque case indique la concentration de CPA en mM utilisée.

Après centrifugation de la plaque 15 minutes à 2000 g, 100 µL de surnageant sont prélevés et mélangés avec 14µL d'une solution de dinitrophenylhydrazine à 0,02 M diluée dans un solvant composé d'un volume d'acide chlorhydrique 1N et de 3 volumes d'acétonitrile. La dinitrophenylhydrazine est un composé capable de réagir avec les aldéhydes et les cétones afin de former un composé de type dinitrophenylhydrazone (Figure 90).

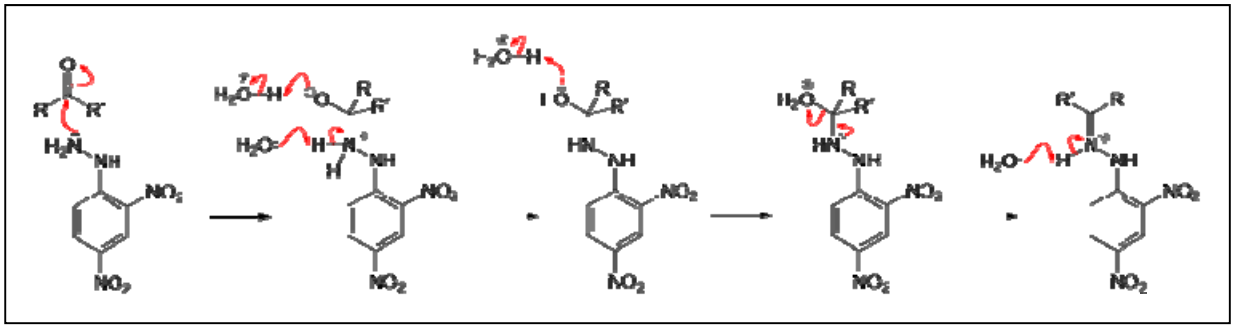


Figure 90. Mécanisme de formation du composé dinitrophenylhydrazone. Réaction de la dinitrophenylhydrazine cyclique avec une cétone.

Or le tautomère du 4-OH CPA, l'aldophosphamide, possède un groupement aldéhyde à une de ses extrémités, lui permettant de réagir avec la dinitrophenylhydrazine. La dérivatisation de l'aldophosphamide en un composé dinitrophenylhydrazone permet d'augmenter la sensibilité de la détection et de stabiliser le métabolite du CYP le temps de l'analyse de la plaque 96 puits en CLHP-SM (Kalhorn, Howald et al. 2006). Après incubation pendant 45 minutes, la plaque est centrifugée 15 minutes à 2000 g à 4°C puis 75 µL du surnageant sont prélevés et analysés en CLHP-SM.

8.3.2. Analyse chromatographique

8.3.2.1. Conditions analytiques

Un appareil de Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (CLHP-SM) est utilisé. Les séparations sont effectuées dans un appareil Waters Alliance 2790 sur une colonne XTerra MS C18 Waters (3,5 µm et 4,6x100 mm). Une phase mobile constituée d'acétonitrile et d'eau, tous deux supplémentés avec 0,01% d'acide formique, est délivrée à travers la colonne chauffée à 40°C à un flux de 1 mL/min.

En bioconversion, le gradient commence à 100% d'eau pour arriver à 50 % d'eau et 50% d'acétonitrile en 8 min puis terminer à 100% d'acétonitrile 10 minutes après l'injection. Le gradient utilisé commence à 70% d'eau et 30% d'acétonitrile pour terminer à 100% d'acétonitrile 10 minutes après l'injection pour les expériences réalisées avec des microsomes. Le spectromètre de masse Waters ZQ985 est équipé d'un électrospray et utilisé en mode de détection d'ionisation positive pour la bioconversion et négative pour les microsomes. L'aire sous les pics détectés est intégrée avec le logiciel Empower de Waters. Deux courbes de calibration de l'appareil sont réalisées en utilisant du mafosfamide, pur ou dérivatisé selon le même protocole utilisé pour la cyclophosphamide (Niemeyer, Engel et al. 1984).

8.3.2.2. Pics et m/z détectés

Masses molaires (MM) des produits analysés :

- CPA : MM = 260 g/mol
- 4-OH CPA : MM = 276 g/mol
- Dinitrophenylhydrazone (CPA + dinitrophenylhydrazine) : MM = 456 g/mol
- Acide coumarique : MM = 164 g/mol

Témoins : une solution de CPA seul (masse molaire MM 260 g/mol) est analysée avec le spectromètre de masse détectant un rapport masse/charge (m/z) de 261, le pic chromatographique apparaissant au temps de rétention 6,2 min. Le spectre de masse de la CPA, avec un profil isotopique caractéristique des produits possédant un groupement bis chloroethyl (la proportion de l'isotope du chlore de masse atomique 37 est importante) est présenté en Annexe II Figure 93. Le surnageant issu du traitement de W(R)V60 avec la CPA est analysé avec les même paramètres.

Bioconversion W(R) 2B6 et 2B11 : le surnageant de ces deux souches traités est analysé avec une détection des rapports m/z 261 (CPA), 259 (4-OH CPA déshydraté) et 277 (4-OH CPA). Pour ce dernier rapport, le pic dont l'aire est calculée est élué à 5,4 min, avant celui de la CPA car le composé est plus polaire, et présentant un profil isotopique similaire à celui de la CPA (Annexe II Figure 94).

Il existe un pic de m/z 277, élué à 7,3 min, donc plus hydrophobe que la CPA, et présentant un profil isotopique similaire à celui de la CPA, mais avec pic principal de m/z 275 et isotopique de m/z 277. Ce pic semble correspondre à un contaminant du substrat ou à un produit de dégradation, les valeurs d'aire sous le pic élué à 7,3 minutes étant proportionnelles à la concentration de substrat.

La détection à un m/z de 259 a été ajoutée après observation du spectre de masse du pic élué à 5,4 min (Annexe II Figure 94). Le profil isotopique caractéristique du groupement bischloroethyl est présent pour ce m/z, indiquant que le métabolite subit une déshydratation au niveau de l'électrospray du spectromètre.

Le calcul de la quantité de 4-OH CPA produite se base donc sur l'addition des aires des pics détectés avec des m/z de 259 et de 277, élués à 5,4 min (chromatogramme Annexe II Figure 95).

Chimères : Le protocole de séparation et de détection mis au point nous permet de visualiser correctement le spectre de masse correspondant au composé dinitrophenylhydrazone, de masse 456 (m/z 455), reconnu grâce à son profil isotopique identique à celui du 4-OH CPA seul (Annexe II Figure 96). Le pic chromatographique correspondant à ce composé est également bien visible (Annexe II Figure 97).

Le spectre de masse de l'acide coumarique (Annexe II Figure 98), de masse 164 (m/z 163) et le pic chromatographique correspondant (Annexe II Figure 99) ont également été observés. Un pic chromatographique observé en détection UV (Annexe II Figure 100), possédant un temps de rétention proche de celui de l'acide coumarique détecté en spectrométrie de masse, nous a permis de déterminer que ce composé présentait un pic d'absorbance à une longueur d'onde de 310 nm (Annexe II Figure 101).

8.4. Effet de la cyclophosphamide (CPA) sur S.cerevisiae

Tous les tests d'exposition des levures à la CPA seront réalisés en utilisant des solutions de produit solubilisé dans de l'éthanol.

8.4.1. Test de croissance en gouttes

Une gamme de concentration de CPA est préparée, chaque concentration est ajoutée séparément à deux géloses SW5 ou SW10 maintenues en surfusion à 45°C puis coulées dans des boîtes de Pétri. Des clones de W(R)2B6 sont prélevés sur des boîtes stocks de SW5 et SW10, dilués puis comptés afin d'obtenir deux suspensions initiales à une concentration similaire.

Ensuite, 7 dilutions successives de chacune de ces suspensions sont effectuées. Les dilutions des suspensions contenant des clones cultivés en SW5 et en SW10 sont déposées en gouttes dans les boîtes SW5 ou SW10 contenant les concentrations de CPA, respectivement. Les boîtes sont incubées durant 36 h.

8.4.2. Test de viabilité et aptitude à la respiration

La souche W(R)2B6 est cultivée en milieu liquide pour exprimer le CYP2B6, comme décrit dans (Pompon, Louerat et al. 1996). Ensuite, 1% (v/v) d'une solution de CPA est ajoutée au milieu de culture et à différents temps de culture, 1 mL de suspension cellulaire est prélevé, lavé deux fois et resuspendue. Après comptage sur cellule de Malassez, la concentration est ajustée et 3 dilutions sont effectuées. En parallèle, des boîtes d'YPGA, contenant du TTC (Merck) à 60 µg/µL, sont préparées. Finalement, chaque suspension cellulaire est déposée et étalée sur une boîte d'YPGA contenant le TTC et sur une boîte témoin (sans TTC), et ceci pour tous les temps de prélèvement. Les boîtes sont incubées 24 h.

8.4.3. Test de croissance en milieu liquide

Pour le premier test, 2 précultures de W(R) et W(R)2B6, dans du SW5 ou du SW10, sont incubées sous agitation durant une nuit. Puis chacune de ces précultures est diluée afin d'obtenir quatre cultures (2 dans SW5 et 2 dans SW10) de concentrations équivalentes. Ces cultures sont remises à incuber et 1 mL de celles-ci est prélevé à intervalles réguliers afin de mesurer la densité optique de la culture.

Pour le deuxième test, 2 précultures de W(R)2B6, dans du SW5 ou du SW10, sont incubées sous agitation durant une nuit. Puis chacune de ces précultures est diluée afin d'obtenir quatre cultures (2 dans SW5 et 2 dans SW10) de concentrations équivalentes. Aux deux cultures témoins SW5 et SW10, de l'éthanol absolu est ajouté, alors que de la CPA est ajoutée aux deux autres cultures. Ces cultures sont remises à incuber et 1 mL de celles-ci est prélevé à intervalles réguliers afin de mesurer la densité optique de la culture. Cette expérience a été réalisée deux fois.

La manipulation des courbes et les calculs découlant de cette expérience sont réalisés avec le logiciel Sigma Plot.

8.4.4. Test du système rapporteur dans *S.cerevisiae*

Des cultures liquides des souches W(R)pLCJ et W(R)pLCJ 1A1, dans du milieu minimum SW5B et SW5, sont incubées à 28°C pendant une nuit puis réparties dans une microplaque selon le protocole décrit par Cahill et al. (Cahill, Knight et al. 2004). Cette plaque est incubée une nuit à 28°C avec des solutions de benzo(a)pyrène dans du dimethylformamide et de chloramphénicol dans l'éthanol. La concentration la plus forte utilisée correspond à la concentration maximale de produit utilisé lors de la validation du test Green Screen avec ces composés (Knight 2004). Puis la plaque est centrifugée et, après un rinçage, les cellules sont reprises dans du Ringer.

L'absorbance des puits est ensuite mesurée avec et la fluorescence (excitation 485 nm, émission 520 nm) avec un fluorimètre SAFAS. Les données brutes extraites de ces mesures sont ensuite traitées selon le protocole mis au point pour le test Green Screen (Cahill, Knight et al. 2004).

8.5. *Caenorhabditis elegans*

8.5.1. Utilisation du surnageant de levure

Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant la souche sauvage *C.elegans* N2 Bristol, maintenue selon les protocoles établis (Brenner 1974). Les cultures sont réalisées à 15°C pour les milieux liquides, et 20°C pour les milieux solides.

Une préculture de W(R)2B11 dans du SWA10 est incubée sous agitation pendant 24h. Cette préculture est ensuite dilué au 1/20e dans du milieu YPGE supplémenté soit d'1% d'éthanol absolu, pour le témoin, soit d'une solution de cyclophosphamide. Les cultures sont agitées à 28°C pendant 48h puis centrifugées. Le culot est repris dans de l'YPGalA supplémenté d'1% d'éthanol absolu (témoin) ou de CPA. Après une nuit d'incubation, les cultures sont centrifugées et le surnageant est récupéré. A ces 2 surnageant sont ajoutés les composants nécessaires à la préparation du milieu de culture S basal (Brenner 1974) et les bactéries essentielles pour la croissance du nématode.

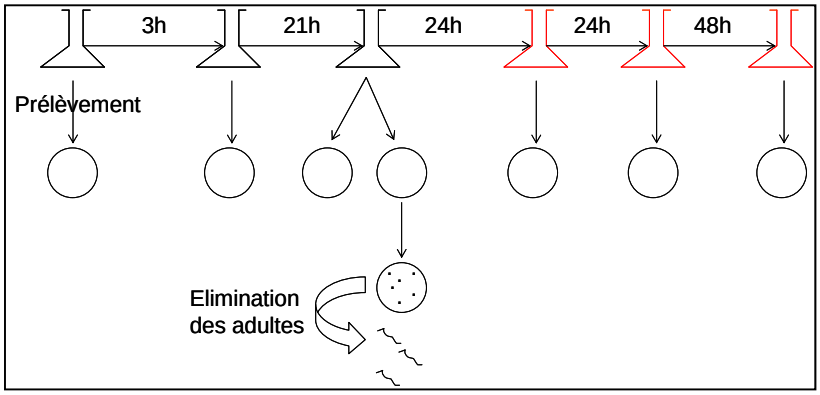


Figure 91. Schématisation des expériences réalisées avec *C.elegans*. Les ronds représentent des boîtes de NGM (Brenner 1974) sur lesquelles est déposé un aliquot de culture à divers intervalles de temps indiqués. Les points noirs sur la boîte du bas représentent les œufs pondus pendant 4-5 heures par les adultes pondants prélevés sur la boîte dessinée au-dessus. Les erlenmeyers rouges représentent des cultures contenant 1/10e des culots issus des cultures précédentes repris dans du milieu frais.

En parallèle, des vers sont récoltés, *via* le rinçage avec du M9 (Brenner 1974), de boîtes contenant des individus à des stades différents. Les vers sont entraînés au fond du tube par une incubation dans la glace, la suspension est centrifugée puis le culot est repris dans du M9 frais. Le comptage des animaux contenus dans cette suspension est effectué sur une boîte

fraîche avec une loupe binoculaire. La moitié de cette suspension est ensuite ajouté à chaque surnageant de culture, témoin et traité. Ces cultures sont mises à incuber en erlenmeyers sous agitation. La suite des manipulations est représentée sur la Figure 91.
Les animaux déposés sur les boîtes sont comptés à la loupe binoculaire immédiatement après leur prélèvement.

8.5.2. Utilisation du mafosfamide

Des animaux adultes en début de ponte sont récupérés à partir de boîtes de NGM puis incubés dans une solution de lyse (Nass and Hamza 2007) permettant de récupérer uniquement les œufs. Après rinçage, ces œufs sont incubés dans du M9 durant une nuit, permettant de prélever le lendemain matin des animaux qui présentent tous un stade relativement identiques.
Des solutions de différentes concentrations de mafosfamide dilué dans l'eau sont ajoutées à du milieu S ensemencé avec des bactéries. Une partie de la suspension de larves de C.elegans est ajoutée au mélange et ces cultures sont incubées sous agitation. Des prélèvements sont effectués chaque soir et chaque matin et déposés sur des boîtes de NGM. Ces boîtes sont observées à la loupe binoculaire à la fin de l'expérience. Environ 60h après la mise en culture initiale, 50 animaux adultes de chaque boîte sont déposés sur une boîte, incubés à 20 °C pendant 2-3 heures puis brûlés. Les œufs issus de cette ponte sont incubés une nuit à 20 °C et observés le lendemain.

9. Annexe II : Résultats

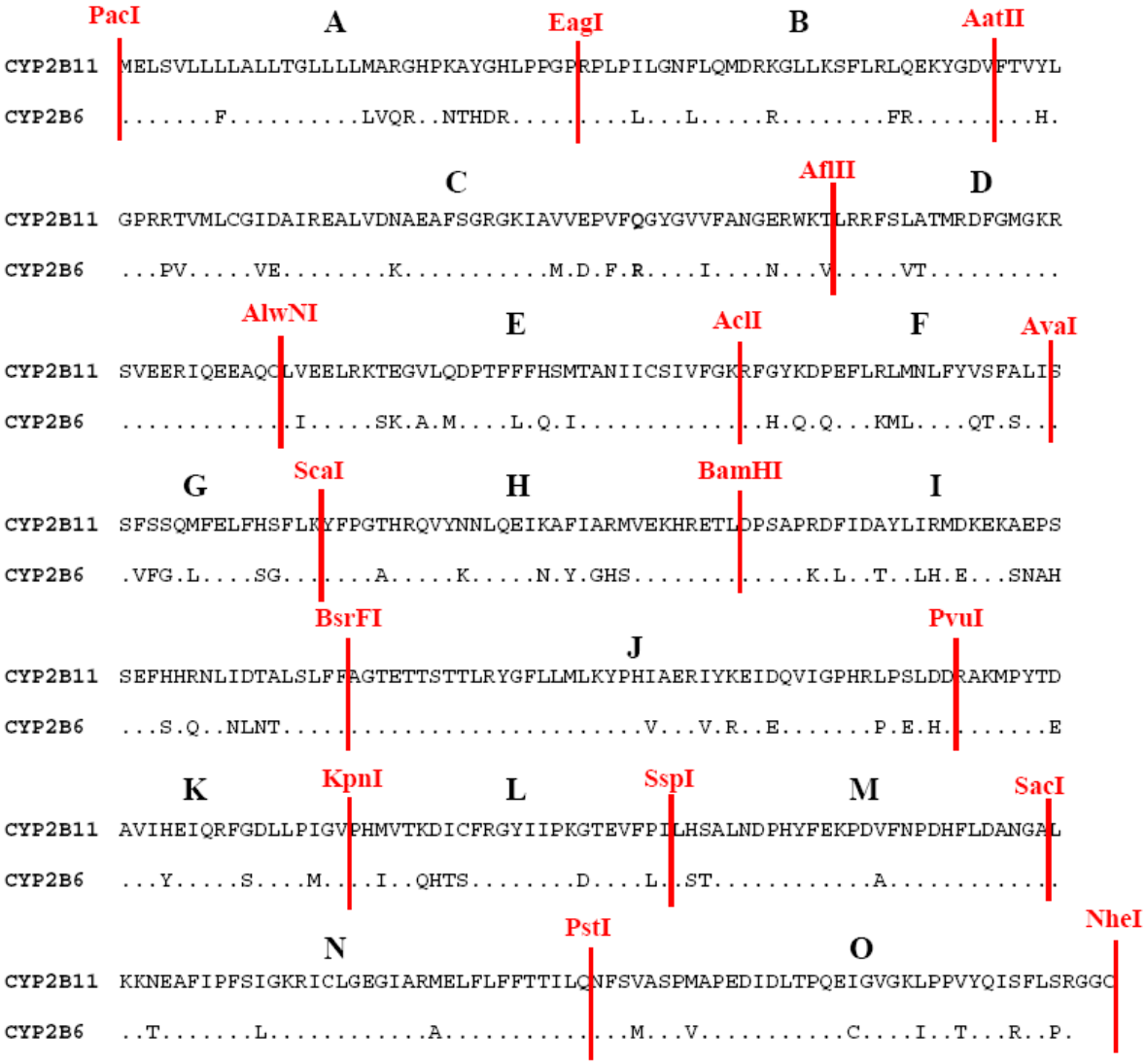


Figure 92. Alignement des séquences protéiques du CYP2B6 et du CYP2B11. Les limites des 15 modules structuraux sont représentées par des barres rouges. Pour le CYP2B11, ces limites correspondent à des séquences constituant des sites de restriction pour des enzymes indiqués au-dessus des séquences en rouge. Les noms des différents segments, de A à O, sont également indiqués au-dessus des séquences.

Nom de la PCR	Méga oligos 2B11			Elongation				Amplification			Résultat
	BssSI - KpnI (chimère L-M)	SacI - AscI (chimère L-M)	p2B6/M13 simple brin utilisé	Taq Qbiogen	Expand	Taq Platinum	Taq Qbiogen	Taq Platinum	Expand High Fidelity		
1	x	x	d		x				x	++	
			i								
2	x	x	d	x			x			+	
			i								
3	x	x	d			x		x		++	
			i								
4	x		d		x				x		
	x	x	d								
		x	i								
	BssSI - AclI (chimère F)	AvaI - AscI (chimère F)	p2B6/M13 simple brin utilisé	Taq Qbiogen	Expand	Taq Platinum	Taq Qbiogen	Taq Platinum	Expand High Fidelity		
5	x	x	d			x		x		-	
			i								
6	x	x	d			x		x		-	
			i								
7	x		d			x		x		-	
	x		i								
8		x	d			x		x		-	
		x	i								
9	x	x	d	x						-	
			i								
10		x	d	x						-	
	x		i								
11	x	x	d			x		x		-	
	x	x	i								
12	x	x	d	x			x			-	
	x	x	i								
13			d	x			x			-	
			i								
14			d			x		x		±	
			i								
15			d	x					x	-	
			i								

Tableau 5. Composition et résultats des différentes élongations et amplifications réalisées dans le cadre de la méthode enzymatique de chimérogenèse. Un résultat positif est considéré comme l'amplification d'un fragment d'ADN à la taille attendue tel qu'observé sur gel d'agarose. Le nombre de + indiqué pour les résultats positifs est relié à l'intensité des bandes observées sur gel d'agarose.

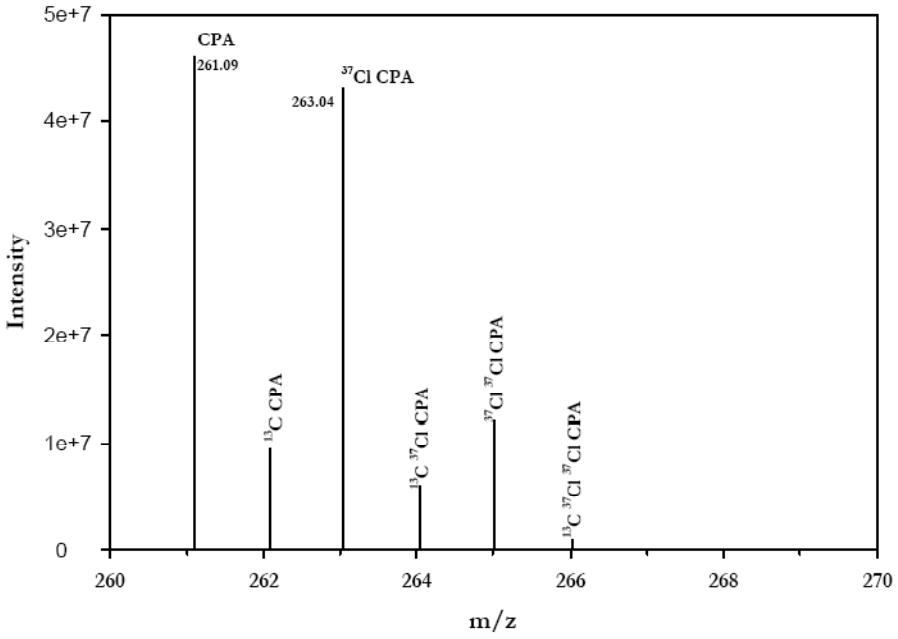
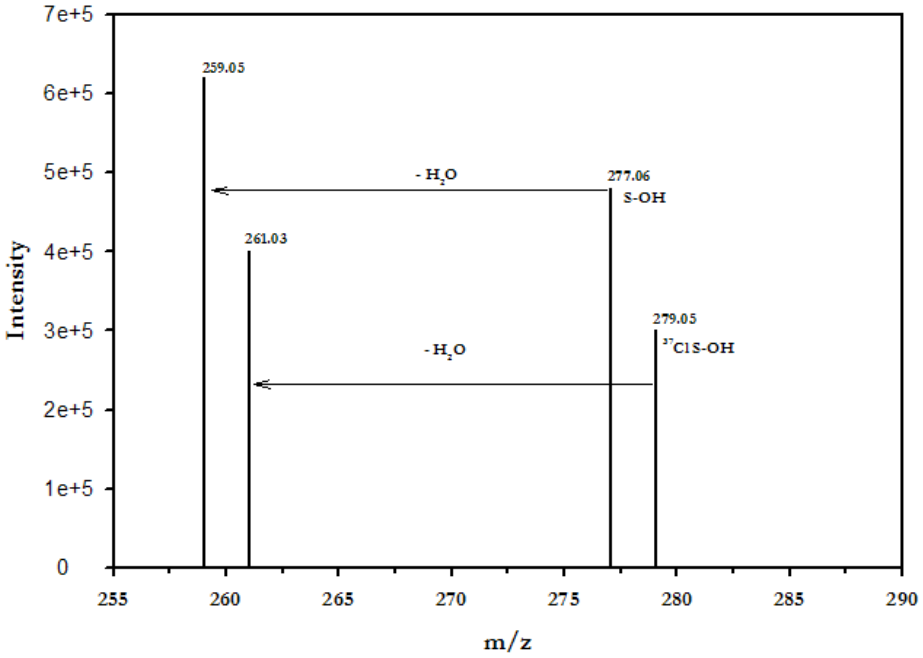


Figure 93. Spectre de masse du pic de substrat (temps de rétention 6,2 min), chaque pic représentant une forme isotopique de la CPA coexistant au sein du pic d'élution.

Figure 94. Spectre de masse correspondant au pic chromatographique observé à 5,4 minutes, seuls les deux pics principaux sont représentés. La lettre S représente le substrat



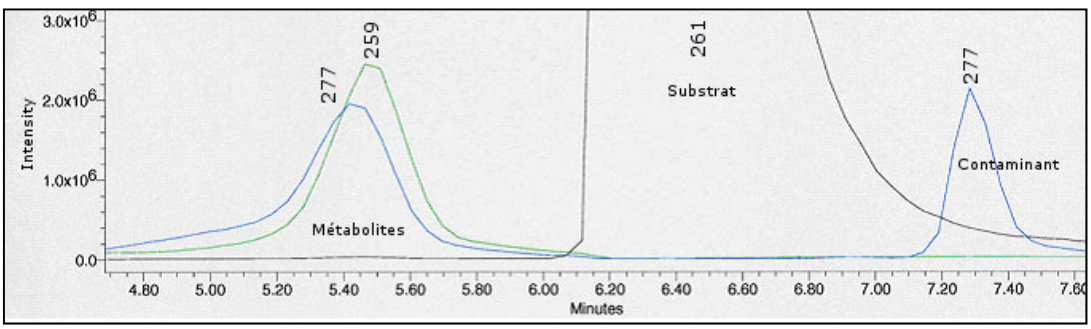


Figure 95. Chromatogramme obtenu lors de l'analyse du surnageant des souches W(R)2B6 et 11 traitées avec de la CPA

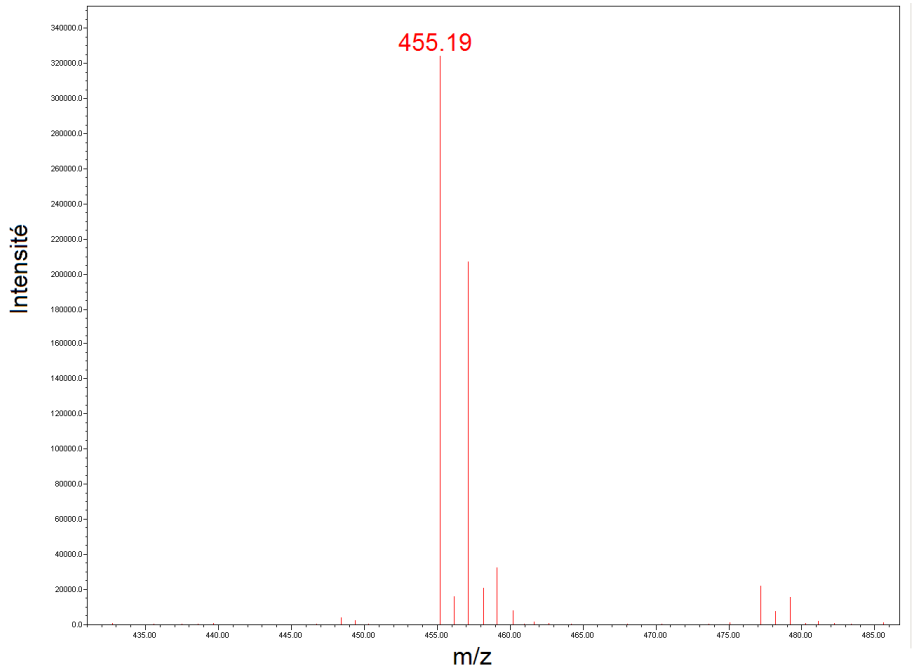


Figure 96. Spectre de masse du composé dinitrophenylhydrazone (m/z 455)

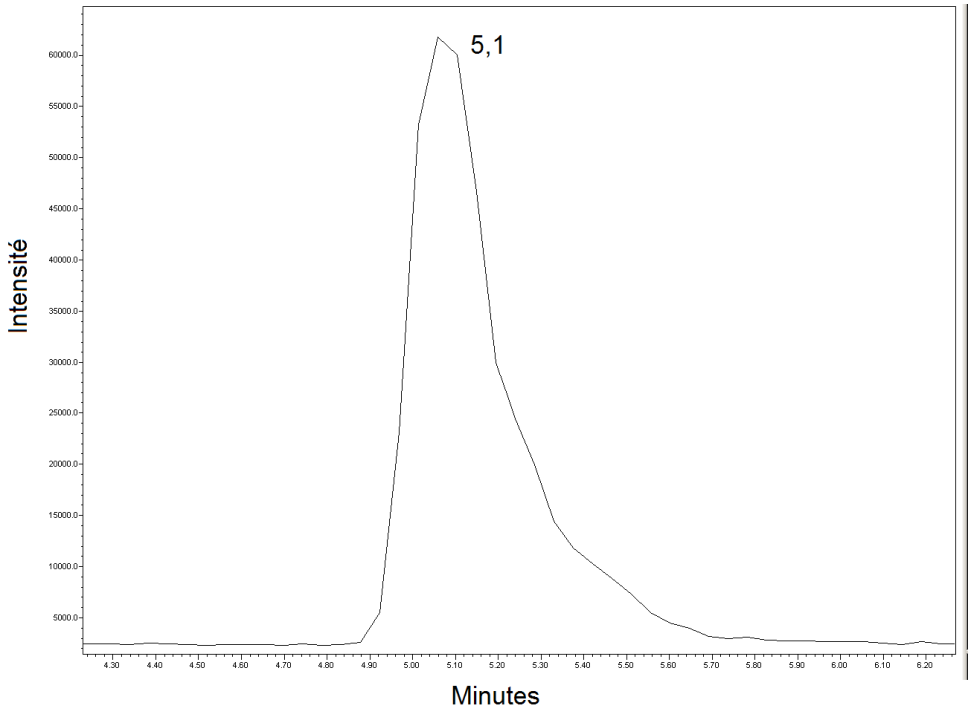


Figure 97. Chromatogramme du composé dinitrophenylhydrazone détecté à un m/z de 455. Temps de rétention 5,1 minutes.

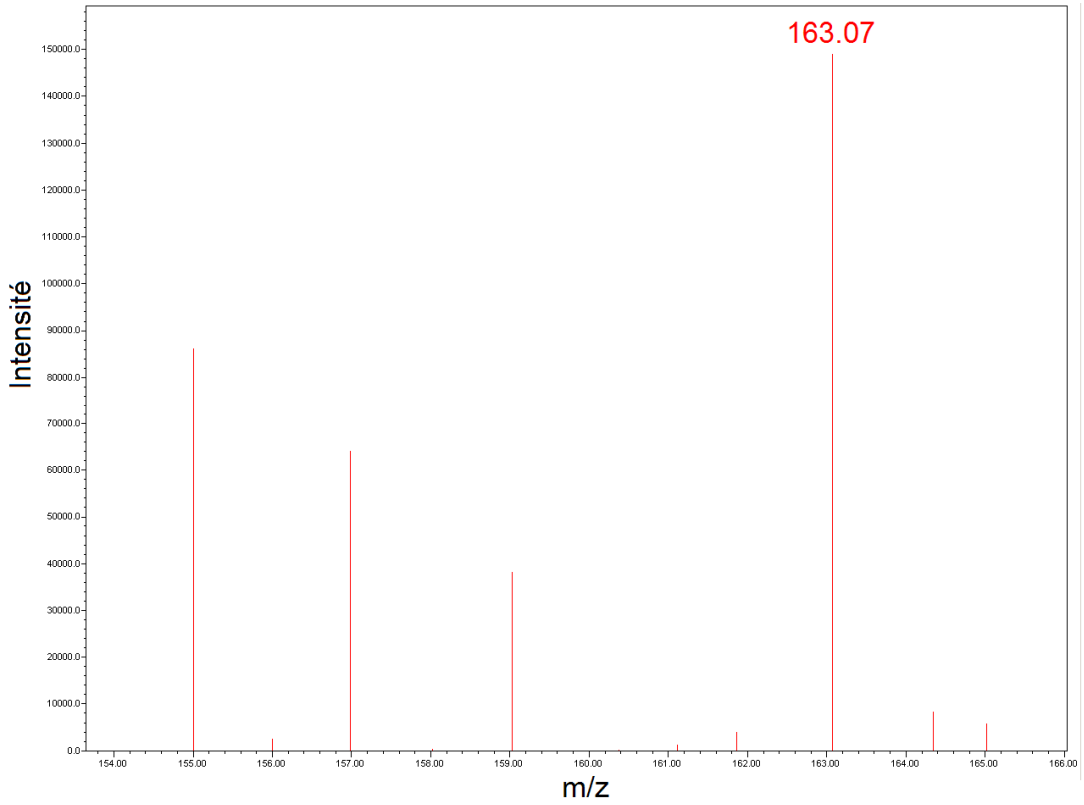


Figure 98. Spectre de masse de l'acide coumarique (m/z 163)

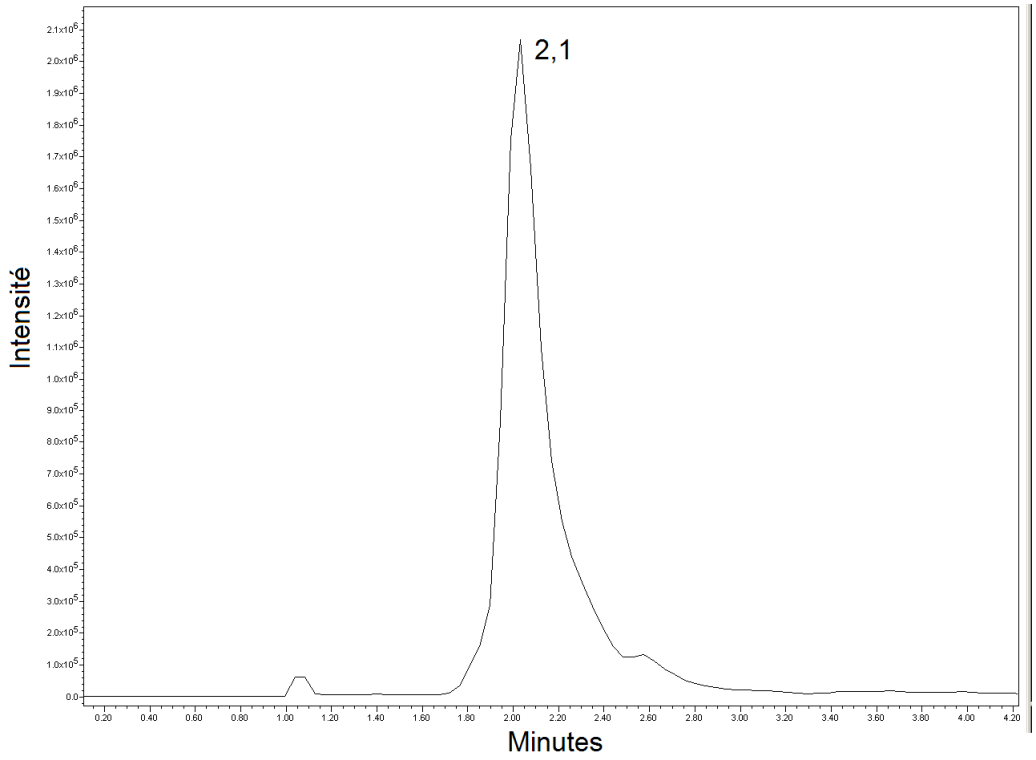


Figure 99. Chromatogramme du composé détecté à un m/z de 163. Temps de rétention 2,1 minutes.

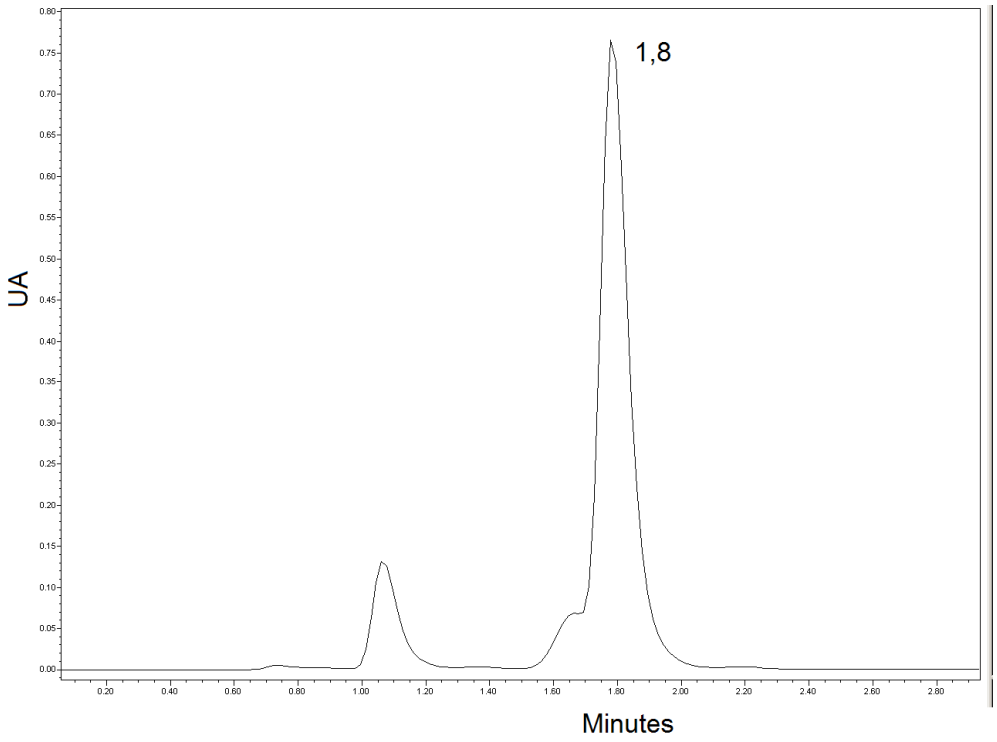


Figure 100. Chromatogramme observé en détection UV. Temps de rétention 1,8 minutes. UA = unités arbitraires

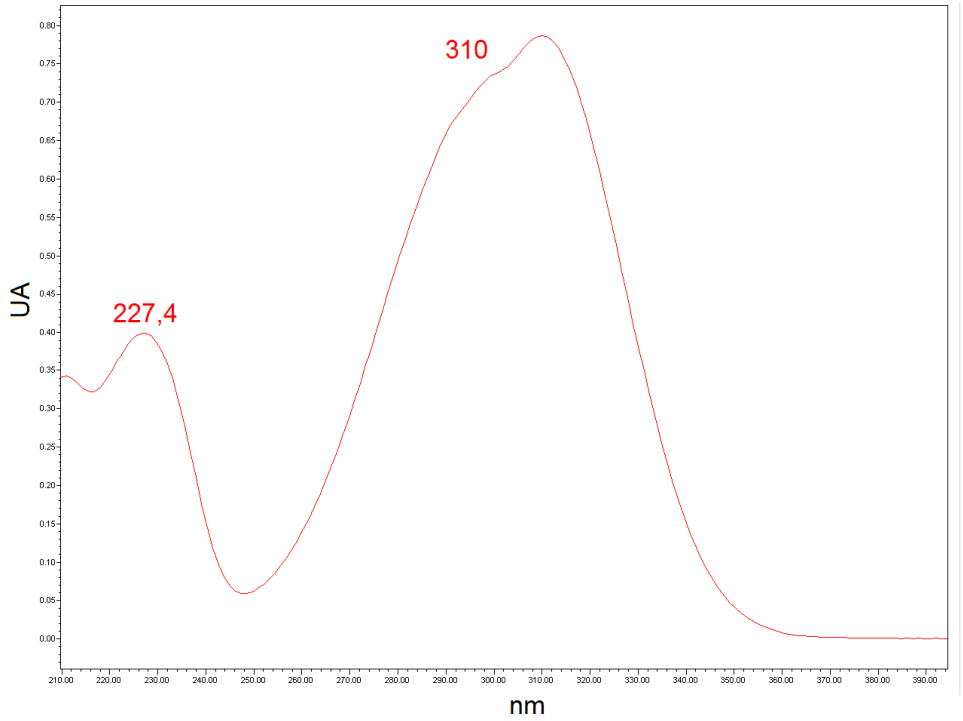


Figure 101. Spectre d'absorption du composé de m/z 163, temps de rétention 1,8 min. UA = unités arbitraires

Tableau 6. Paramètre de cytotoxicité : absorbance relative en % (Cahill, Knight et al. 2004).

DMF = dimethylformamide, BAP = benzo(a)pyrène.

Traitement / Souche	1% DMF	1% ethanol	0,05 mM BAP	0,1 mM BAP	0,25 mM Chloramphenicol	0,5 mM Chloramphenicol
W(R)V60	100	100	84,9	90,7	75,4	67,1
W(R)pLCJ	100	100	67,7	51,8	76,9	50,6
W(R)pLCJ 1A1	100	100	73,4	59,6	72,8	47,3

Tableau 7. Paramètre de génotoxicité : luminosité induite (Cahill, Knight et al. 2004).

Traitement / Souche	1% DMF	1% ethanol	0,05 mM BAP	0,1 mM BAP	0,25 mM Chloramphenicol	0,5 mM Chloramphenicol
W(R)V60 corrigée par W(R)pLCJ	0,79	0,80	0,78	1,46	1,28	1,29
W(R)V60 corrigée par W(R)pLCJ 1A1	0,92	0,81	0,91	1,05	1,29	1,29
W(R)pLCJ	1,00	1,00	1,40	1,81	0,92	1,42
W(R)pLCJ 1A1	1,00	1,00	1,33	1,61	1,06	1,96

Tableau 8. Paramètre de génotoxicité : luminosité relative induite (Cahill, Knight et al. 2004).

Traitement / Souche	1% DMF	1% ethanol	0,05 mM BAP	0,1 mM BAP	0,25 mM Chloramphenicol	0,5 mM Chloramphenicol
W(R)pLCJ	1,00	1,00	2,97	4,38	-0,36	0,13
W(R)pLCJ 1A1	1,00	1,00	1,16	1,55	-0,39	1,13

Tableau 9. Cytotoxicité et génotoxicité du BAP et du chloramphénicol sur les souches W(R)V60, W(R)pLCJ et W(R)pLCJ 1A1, déduites des paramètres présentés dans les tableauxTableau 6Tableau 7Tableau 8.

	Cytotoxicité*			Génotoxicité**		
Souche / Traitement	W(R)V60	W(R)pLCJ	W(R)pLCJ 1A1	W(R)V60	W(R)pLCJ	W(R)pLCJ 1A1
Benzo(a)pyrène	-	+	+	+	+	?
Chloramphenicol	+	+	++	-	++	?

* Seuil de cytotoxicité +: < 80 % d'absorbance relative pour 1 ou 2 concentrations testées.
* Seuil de cytotoxicité ++ : < 50% d'absorbance relative pour au moins 1 des concentrations testées
** Seuil de génotoxicité + : luminosité induite ou induite relative > 1,3 pour au moins une des concentrations testées.
** Seuil de génotoxicité ++ : luminosité induite ou induite relative > 1,6 pour au moins une des concentrations testées.

Bibliographie

Abecassis, V., D. Pompon and G. Truan (2000). "High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2." *Nucleic Acids Res* **28**(20): E88.

Abecassis, V., D. Pompon and G. Truan (2003). "Producing chimeric genes by CLERY: in vitro and in vivo recombination." *Methods Mol Biol* **231**: 165-73.

Abecassis, V., P. Urban, L. Aggerbeck, G. Truan and D. Pompon (2003). "Exploration of Natural and Artificial Sequence Spaces: Towards a Functional Remodeling of Membrane-bound Cytochrome P450 " *Biocatalysis and Biotransformation* **21**(2): 55-66.

Agard, C., C. Ligeza, B. Dupas, A. Izembart, C. El Kouri, P. Moullier and N. Ferry (2001). "Immune-dependent distant bystander effect after adenovirus-mediated suicide gene transfer in a rat model of liver colorectal metastasis." *Cancer Gene Ther* **8**(2): 128-36.

Aghi, M., T. C. Chou, K. Suling, X. O. Breakefield and E. A. Chiocca (1999). "Multimodal cancer treatment mediated by a replicating oncolytic virus that delivers the oxazaphosphorine/rat cytochrome P450 2B1 and ganciclovir/herpes simplex virus thymidine kinase gene therapies." *Cancer Res* **59**(16): 3861-5.

Albert, A. (1958). "Chemical aspects of selective toxicity." *Nature* **182**(4633): 421-2.

Albertini, S. (1991). "Reevaluation of the 9 compounds reported conclusive positive in yeast Saccharomyces cerevisiae aneuploidy test systems by the Gene-Tox Program using strain D61.M of Saccharomyces cerevisiae." *Mutat Res* **260**(2): 165-80.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.

Anderson, D., J. B. Bishop, R. C. Garner, P. Ostrosky-Wegman and P. B. Selby (1995). "Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks." *Mutat Res* **330**(1-2): 115-81.

Anlezark, G. M., R. G. Melton, R. F. Sherwood, W. R. Wilson, W. A. Denny, B. D. Palmer, R. J. Knox, F. Friedlos and A. Williams (1995). "Bioactivation of dinitrobenzamide mustards by an E. coli B nitroreductase." *Biochem Pharmacol* **50**(5): 609-18.

Arnold, F. H. (2001). "Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design." *Nature* **409**(6817): 253-7.

Bachofen, V., R. J. Schweyen, K. Wolf and F. Kaudewitz (1972). "Quantitative selection of respiratory deficient mutants in yeasts by triphenyltetrazolium chloride." *Z. Naturforsch. [B]* **27**(3): 252-6.

Barnes, H. J., M. P. Arlotto and M. R. Waterman (1991). "Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5597-601.

Barton-Burke, M. and G. M. Wilkes (2006). *Cancer Therapies*. Sudbury, MA: Jones&Bartlett.

Bathelt, C., R. D. Schmid and J. Pleiss (2002). "Regioselectivity of CYP2B6: homology modeling, molecular dynamics simulation, docking." *J Mol Model* **8**(11): 327-35.

Bellocq, N. C., S. H. Pun, G. S. Jensen and M. E. Davis (2003). "Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery." *Bioconjug Chem* **14**(6): 1122-32.

Beukers, R., A. P. Eker and P. H. Lohman (2008). "50 years thymine dimer." *DNA Repair (Amst)* **7**(3): 530-43.

Biagini, C. P., R. M. Philpot and C. M. Celier (1999). "Nonsubstrate recognition site residues are involved in testosterone hydroxylation by cytochrome P450 CYP 2C11." *Arch Biochem Biophys* **361**(2): 309-14.

Bignold, L. P. (2006). "Alkylating agents and DNA polymerases." *Anticancer Res* **26**(2B): 1327-36.

Black, S. M., S. Ellard, R. R. Meehan, J. M. Parry, M. Adesnik, J. D. Beggs and C. R. Wolf (1989). "The expression of cytochrome P450IIB1 in Saccharomyces cerevisiae results in an increased mutation frequency when exposed to cyclophosphamide." *Carcinogenesis* **10**(11): 2139-43.

Bloom, J. D., M. M. Meyer, P. Meinhold, C. R. Otey, D. MacMillan and F. H. Arnold (2005). "Evolving strategies for enzyme engineering." *Curr Opin Struct Biol* **15**(4): 447-52.

Boddy, A. V. and S. M. Yule (2000). "Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines." *Clin Pharmacokinet* **38**(4): 291-304.

Bohr, V. A., D. H. Phillips and P. C. Hanawalt (1987). "Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome." *Cancer Res* **47**(24 Pt 1): 6426-36.

Braybrooke, J. P., A. Slade, G. Deplanque, R. Harrop, S. Madhusudan, M. D. Forster, R. Gibson, A. Makris, D. C. Talbot, J. Steiner, L. White, O. Kan, S. Naylor, M. W. Carroll, S. M. Kingsman and A. L. Harris (2005). "Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma." *Clin Cancer Res* **11**(4): 1512-20.

Breger, J., B. B. Fuchs, G. Aperis, T. I. Moy, F. M. Ausubel and E. Mylonakis (2007). "Antifungal chemical compounds identified using a C. elegans pathogenicity assay." *PLoS Pathog* **3**(2): e18.

Brenner, S. (1974). "The genetics of Caenorhabditis elegans." *Genetics* **77**(1): 71-94.

Brodie, B. B., J. Axelrod, J. R. Cooper, L. Gaudette, B. N. La Du, C. Mitoma and S. Udenfriend (1955). "Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes." *Science* **121**(3147): 603-4.

Brogden, R. N. and P. Chrisp (1991). "Flutamide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in advanced prostatic cancer." *Drugs Aging* **1**(2): 104-15.

Browder, T., C. E. Butterfield, B. M. Kraling, B. Shi, B. Marshall, M. S. O'Reilly and J. Folkman (2000). "Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer." *Cancer Res* **60**(7): 1878-86.

Bubley, G. J., G. K. Ogata, N. P. Dupuis and B. A. Teicher (1994). "Detection of sequence-specific antitumor alkylating agent DNA damage from cells treated in culture and from a patient." *Cancer Res* **54**(24): 6325-9.

Bumpus, N. N., C. Sridar, U. M. Kent and P. F. Hollenberg (2005). "The naturally occurring cytochrome P450 (P450) 2B6 K262R mutant of P450 2B6 exhibits alterations in substrate metabolism and inactivation." *Drug Metab Dispos* **33**(6): 795-802.

Byrne, J. D., T. Betancourt and L. Brannon-Peppas (2008). "Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(15): 1615-26.

Cadwell, R. C. and G. F. Joyce (1994). "Mutagenic PCR." *PCR Methods Appl* **3**(6): S136-40.

Cahill, P. A., A. W. Knight, N. Billinton, M. G. Barker, L. Walsh, P. O. Keenan, C. V. Williams, D. J. Tweats and R. M. Walmsley (2004). "The GreenScreen genotoxicity assay: a screening validation programme." *Mutagenesis* **19**(2): 105-19.

Cali, J. J., C. L. Hsieh, U. Francke and D. W. Russell (1991). "Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis." *J Biol Chem* **266**(12): 7779-83.

Cali, J. J. and D. W. Russell (1991). "Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis." *J Biol Chem* **266**(12): 7774-8.

Carbone, M. N. and F. H. Arnold (2007). "Engineering by homologous recombination: exploring sequence and function within a conserved fold." *Curr Opin Struct Biol* **17**(4): 454-9.

Cartwright, A. M., E. K. Lim, C. Kleanthous and D. J. Bowles (2008). "A kinetic analysis of regiospecific glucosylation by two glycosyltransferases of Arabidopsis thaliana: domain swapping to introduce new activities." *J Biol Chem* **283**(23): 15724-31.

Cascorbi, I. (2003). "Pharmacogenetics of cytochrome p4502D6: genetic background and clinical implication." *Eur J Clin Invest* **33 Suppl 2**: 17-22.

Chang, T. K., G. F. Weber, C. L. Crespi and D. J. Waxman (1993). "Differential activation of cyclophosphamide and ifosphamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes." *Cancer Research* **53**(23): 5629-37.

Chapman, A. P. (2002). "PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review." *Adv Drug Deliv Rev* **54**(4): 531-45.

Chapman, A. P., P. Antoniw, M. Spitali, S. West, S. Stephens and D. J. King (1999). "Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives." *Nat Biotechnol* **17**(8): 780-3.

Chase, M., R. Y. Chung and E. A. Chiocca (1998). "An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy." *Nat Biotechnol* **16**(5): 444-8.

Chen, C. S., Y. Jounaidi, T. Su and D. J. Waxman (2007). "Enhancement of intratumoral cyclophosphamide pharmacokinetics and antitumor activity in a P450 2B11-based cancer gene therapy model." *Cancer Gene Ther* **14**(12): 935-44.

Chen, C. S., J. T. Lin, K. A. Goss, Y. A. He, J. R. Halpert and D. J. Waxman (2004). "Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics." *Mol Pharmacol* **65**(5): 1278-85.

Chen, G. L., L. Yang, T. C. Rowe, B. D. Halligan, K. M. Tewey and L. F. Liu (1984). "Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II." *J Biol Chem* **259**(21): 13560-6.

Chen, J., H. Wu, D. Han and C. Xie (2006). "Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer." *Cancer Lett* **231**(2): 169-75.

Chen, L., D. Chen, Y. Manome, Y. Dong, H. A. Fine and D. W. Kufe (1995). "Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter." *J Clin Invest* **96**(6): 2775-82.

Chen, L. and D. J. Waxman (1995). "Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy." *Cancer Res* **55**(3): 581-9.

Chen, L., L. J. Yu and D. J. Waxman (1997). "Potentiation of cytochrome P450/cyclophosphamide-based cancer gene therapy by coexpression of the P450 reductase gene." *Cancer Res* **57**(21): 4830-7.

Chen, Y., T. DeWeese, J. Dilley, Y. Zhang, Y. Li, N. Ramesh, J. Lee, R. Pennathur-Das, J. Radzyminski, J. Wypych, D. Brignetti, S. Scott, J. Stephens, D. B. Karpf, D. R. Henderson and D. C. Yu (2001). "CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity." *Cancer Res* **61**(14): 5453-60.

Cheng, L., P. R. Ziegelhoffer and N. S. Yang (1993). "In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10): 4455-9.

Chiang, C. W., H. C. Yeh, L. H. Wang and N. L. Chan (2006). "Crystal structure of the human prostacyclin synthase." *J Mol Biol* **364**(3): 266-74.

Choi, J. S., Y. W. Jun, S. I. Yeon, H. C. Kim, J. S. Shin and J. Cheon (2006). "Biocompatible heterostructured nanoparticles for multimodal biological detection." *J Am Chem Soc* **128**(50): 15982-3.

Cirino, P. C. and F. H. Arnold (2002). "Protein engineering of oxygenases for biocatalysis." *Curr Opin Chem Biol* **6**(2): 130-5.

Claveau, S., M. Sasseville and M. Beauregard (2004). "Alcohol-mediated error-prone PCR." *DNA Cell Biol* **23**(11): 789-95.

Coco, W. M., W. E. Levinson, M. J. Crist, H. J. Hektor, A. Darzins, P. T. Pienkos, C. H. Squires and D. J. Monticello (2001). "DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes." *Nat Biotechnol* **19**(4): 354-9.

Code, E. L., C. L. Crespi, B. W. Penman, F. J. Gonzalez, T. K. Chang and D. J. Waxman (1997). "Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation." *Drug Metab Dispos* **25**(8): 985-93.

Cojocaru, V., P. J. Winn and R. C. Wade (2007). "The ins and outs of cytochrome P450s." *Biochim Biophys Acta* **1770**(3): 390-401.

Cole, G. M., D. Schild, S. T. Lovett and R. K. Mortimer (1987). "Regulation of RAD54- and RAD52-lacZ gene fusions in Saccharomyces cerevisiae in response to DNA damage." *Mol Cell Biol* **7**(3): 1078-84.

Colvin, M., J. E. Russo, J. Hilton, D. M. Dulik and C. Fenselau (1988). "Enzymatic mechanisms of resistance to alkylating agents in tumor cells and normal tissues." *Adv Enzyme Regul* **27**: 211-21.

Conconi, A., P. Jager-Vottero, X. Zhang, B. C. Beard and M. J. Smerdon (2000). "Mitotic viability and metabolic competence in UV-irradiated yeast cells." *Mutation Research* **459**(1): 55-64.

Coon, M. J. (2005). "Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 1-25.

Cooper, D. Y., R. W. Estabrook and O. Rosenthal (1963). "The stoichiometry of C21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes." *J Biol Chem* **238**: 1320-3.

Cooper, J. R., J. Axelrod and B. B. Brodie (1954). "Inhibitory effects of beta-diethylaminoethyl diphenylpropylacetate on a variety of drug metabolic pathways in vitro." *J Pharmacol Exp Ther* **112**(1): 55-63.

Cormack, B. P., G. Bertram, M. Egerton, N. A. Gow, S. Falkow and A. J. Brown (1997). "Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP)a reporter of gene expression in Candida albicans." *Microbiology* **143 (Pt 2)**: 303-11.

Cosme, J. and E. F. Johnson (2000). "Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding." *J Biol Chem* **275**(4): 2545-53.

Crameri, A., S. A. Raillard, E. Bermudez and W. P. Stemmer (1998). "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution." *Nature* **391**(6664): 288-91.

Crameri, A., E. A. Whitehorn, E. Tate and W. P. Stemmer (1996). "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling." *Nat Biotechnol* **14**(3): 315-9.

Crespi, C. L. and V. P. Miller (1999). "The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future." *Pharmacol Ther* **84**(2): 121-31.

Czerwinski, M., T. L. McLemore, H. V. Gelboin and F. J. Gonzalez (1994). "Quantification of CYP2B7, CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors." *Cancer Res* **54**(4): 1085-91.

Dameron, K. M., O. V. Volpert, M. A. Tainsky and N. Bouck (1994). "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1." *Science* **265**(5178): 1582-4.

Davis, B. G. and M. A. Robinson (2002). "Drug delivery systems based on sugar-macromolecule conjugates." *Curr Opin Drug Discov Devel* **5**(2): 279-88.

Davis, M. E., Z. G. Chen and D. M. Shin (2008). "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer." *Nat Rev Drug Discov* **7**(9): 771-82.

Davydov, D. R. (2001). "Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling?" *Trends Biochem Sci* **26**(3): 155-60.

Davydov, R., T. M. Makris, V. Kofman, D. E. Werst, S. G. Sligar and B. M. Hoffman (2001). "Hydroxylation of camphor by reduced oxy-cytochrome P450cam: mechanistic implications of EPR and ENDOR studies of catalytic intermediates in native and mutant enzymes." *J Am Chem Soc* **123**(7): 1403-15.

De Jong, W. H. and P. J. Borm (2008). "Drug delivery and nanoparticles:applications and hazards." *Int J Nanomedicine* **3**(2): 133-49.

De Lemos-Chiarandini, C., A. B. Frey, D. D. Sabatini and G. Kreibich (1987). "Determination of the membrane topology of the phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4 using site-specific antibodies." *J Cell Biol* **104**(2): 209-19.

Degtyarenko, K. N. and A. I. Archakov (1993). "Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems." *FEBS Lett* **332**(1-2): 1-8.

Della Morte, R., M. A. Belisario, P. Remondelli, B. Mugnoz and N. Staiano (1986). "In vitro activation of isophosphamide and trophosphamide to metabolites mutagenic for bacteria." *Toxicol Lett* **31**(3): 183-8.

Desta, Z., B. A. Ward, N. V. Soukhova and D. A. Flockhart (2004). "Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6." *J Pharmacol Exp Ther* **310**(3): 1062-75.

Ding, X. and L. S. Kaminsky (2003). "Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 149-73.

Dirven, H. A., B. van Ommen and P. J. van Bladeren (1994). "Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione." *Cancer Res* **54**(23): 6215-20.

Dolphin, D., B. R. James and H. C. Welborn (1979). "Proton activities for three states of cytochrome P-450cam." *Biochem Biophys Res Commun* **88**(2): 415-21.

Domanski, T. L. and J. R. Halpert (2001). "Analysis of mammalian cytochrome P450 structure and function by site-directed mutagenesis." *Curr Drug Metab* **2**(2): 117-37.

Domanski, T. L., K. M. Schultz, F. Roussel, J. C. Stevens and J. R. Halpert (1999). "Structure-function analysis of human cytochrome P-450 2B6 using a novel substrate, site-directed mutagenesis, and molecular modeling." *J Pharmacol Exp Ther* **290**(3): 1141-7.

Dong, J. and T. D. Porter (1996). "Coexpression of mammalian cytochrome P450 and reductase in Escherichia coli." *Arch Biochem Biophys* **327**(2): 254-9.

Duncan, R., S. Gac-Breton, R. Keane, R. Musila, Y. N. Sat, R. Satchi and F. Searle (2001). "Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic." *J Control Release* **74**(1-3): 135-46.

Dunn, A. R., I. J. Dmochowski, A. M. Bilwes, H. B. Gray and B. R. Crane (2001). "Probing the open state of cytochrome P450cam with ruthenium-linker substrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12420-5.

Dunn, A. R., A. M. Hays, D. B. Goodin, C. D. Stout, R. Chiu, J. R. Winkler and H. B. Gray (2002). "Fluorescent probes for cytochrome p450 structural characterization and inhibitor screening." *J Am Chem Soc* **124**(35): 10254-5.

Durr, U. H., L. Waskell and A. Ramamoorthy (2007). "The cytochromes P450 and b5 and their reductases--promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy." *Biochim Biophys Acta* **1768**(12): 3235-59.

Eaton, J. D., M. J. Perry, S. M. Todryk, R. A. Mazucco, R. S. Kirby, J. R. Griffiths and A. G. Dalgleish (2001). "Genetic prodrug activation therapy (GPAT) in two rat prostate models generates an immune bystander effect and can be monitored by magnetic resonance techniques." *Gene Ther* **8**(7): 557-67.

Edwards, R. J., D. A. Adams, P. S. Watts, D. S. Davies and A. R. Boobis (1998). "Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans." *Biochem Pharmacol* **56**(3): 377-87.

Ekhart, C., S. Rodenhuis, P. H. Smits, J. H. Beijnen and A. D. Huitema (2008). "Relations between polymorphisms in drug-metabolising enzymes and toxicity of chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin." *Pharmacogenet Genomics* **18**(11): 1009-15.

Ekins, S., M. Iyer, M. D. Krasowski and E. D. Kharasch (2008). "Molecular characterization of CYP2B6 substrates." *Curr Drug Metab* **9**(5): 363-73.

El-Sayed, I. H., X. Huang and M. A. El-Sayed (2006). "Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles." *Cancer Lett* **239**(1): 129-35.

Emren, L. O., S. Kurtovic, A. Runarsdottir, A. K. Larsson and B. Mannervik (2006). "Functionally diverging molecular quasi-species evolve by crossing two enzymes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 10866-70.

Endelman, J. B., J. J. Silberg, Z. G. Wang and F. H. Arnold (2004). "Site-directed protein recombination as a shortest-path problem." *Protein Eng Des Sel* **17**(7): 589-94.

Estabrook, R. W., J. Baron, J. Peterson and Y. Ishimura (1971). "Oxygenated cytochrome P-450 as an intermediate in hydroxylation reactions." *Biochem J* **125**(2): 3P-4P.

Estabrook, R. W., D. Y. Cooper and O. Rosenthal (1963). "The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition of the Steroid C21-Hydroxylase System of the Adrenal Cortex." *Biochem Z* **338**: 741-55.

Eswar, N., D. Eramian, B. Webb, M. Y. Shen and A. Sali (2008). "Protein structure modeling with MODELLER." *Methods Mol Biol* **426**: 145-59.

Evans, W. E. and M. V. Relling (1999). "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." *Science* **286**(5439): 487-91.

Ewald, B., D. Sampath and W. Plunkett (2008). "Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death." *Oncogene* **27**(50): 6522-37.

Fawaz, F., F. Bonini, M. Guyot, A. M. Lagueny, H. Fessi and J. P. Devissaguet (1993). "Influence of poly(DL-lactide) nanocapsules on the biliary clearance and enterohepatic circulation of indomethacin in the rabbit." *Pharm Res* **10**(5): 750-6.

Feyereisen, R. (1999). "Insect P450 enzymes." *Annu Rev Entomol* **44**: 507-33.

Fleming, R. A. (1997). "An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology." *Pharmacotherapy* **17**(5 Pt 2): 146S-154S.

Fortina, P., L. J. Kricka, D. J. Graves, J. Park, T. Hyslop, F. Tam, N. Halas, S. Surrey and S. A. Waldman (2007). "Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer." *Trends Biotechnol* **25**(4): 145-52.

Fox, M. and D. Scott (1980). "The genetic toxicology of nitrogen and sulphur mustard." *Mutat Res* **75**(2): 131-68.

Frei, J. V., D. H. Swenson, W. Warren and P. D. Lawley (1978). "Alkylation of deoxyribonucleic acid in vivo in various organs of C57BL mice by the carcinogens N-methyl-N-nitrosourea, N-ethyl-N-nitrosourea and ethyl methanesulphonate in relation to induction of thymic lymphoma. Some applications of high-pressure liquid chromatography." *Biochem J* **174**(3): 1031-44.

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (1995). *DNA repair and mutagenesis*. 1st edition. Washington: ASM Press.

Fuchs, R. and A. Tissier (2005). Réparation de l'ADN et cancer. In: R. Lacave, C.J. Larsen and J. Robert. *Cancérologie fondamentale*. 1 Paris: John Libbey Eurotext, p. 121-129.

Game, J. C. and R. K. Mortimer (1974). "A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast." *Mutat Res* **24**(3): 281-92.

Garfinkel, D. (1958). "Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions." *Arch Biochem Biophys* **77**(2): 493-509.

Gervot, L., B. Rochat, J. C. Gautier, F. Bohnenstengel, H. Kroemer, V. de Berardinis, H. Martin, P. Beaune and I. de Waziers (1999). "Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities." *Pharmacogenetics* **9**(3): 295-306.

Gillam, E. M. (2007). "Extending the capabilities of nature's most versatile catalysts: directed evolution of mammalian xenobiotic-metabolizing P450s." *Arch Biochem Biophys* **464**(2): 176-86.

Gillam, E. M. (2008). "Engineering cytochrome p450 enzymes." *Chem Res Toxicol* **21**(1): 220-31.

Giorgianni, F., P. K. Bridson, B. P. Sorrentino, J. Pohl and R. L. Blakley (2000). "Inactivation of aldophosphamide by human aldehyde dehydrogenase isozyme 3." *Biochem Pharmacol* **60**(3): 325-38.

Glieder, A., E. T. Farinas and F. H. Arnold (2002). "Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase." *Nat Biotechnol* **20**(11): 1135-9.

Gonzalez, F. J. (1988). "The molecular biology of cytochrome P450s." *Pharmacol Rev* **40**(4): 243-88.

Gonzalez, F. J. and S. Kimura (1999). "Role of gene knockout mice in understanding the mechanisms of chemical toxicity and carcinogenesis." *Cancer Lett* **143**(2): 199-204.

Gonzalez, F. J. and D. W. Nebert (1990). "Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation." *Trends Genet* **6**(6): 182-6.

Gonzalez, F. J., R. C. Skoda, S. Kimura, M. Umeno, U. M. Zanger, D. W. Nebert, H. V. Gelboin, J. P. Hardwick and U. A. Meyer (1988). "Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism." *Nature* **331**(6155): 442-6.

Gonzalez, R., L. Hutchins, J. Nemunaitis, M. Atkins and P. O. Schwarzenberger (2006). "Phase 2 trial of Allovectin-7 in advanced metastatic melanoma." *Melanoma Res* **16**(6): 521-6.

Gotoh, O. (1992). "Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences." *J Biol Chem* **267**(1): 83-90.

Gourley, P. L., J. K. Hendricks, A. E. McDonald, R. G. Copeland, K. E. Barrett, C. R. Gourley, K. K. Singh and R. K. Naviaux (2005). "Mitochondrial correlation microscopy and nanolaser spectroscopy - new tools for biophotonic detection of cancer in single cells." *Technol Cancer Res Treat* **4**(6): 585-92.

Graham-Lorence, S., B. Amarneh, R. E. White, J. A. Peterson and E. R. Simpson (1995). "A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450." *Protein Sci* **4**(6): 1065-80.

Graham, S. E. and J. A. Peterson (1999). "How similar are P450s and what can their differences teach us?" *Arch Biochem Biophys* **369**(1): 24-9.

Gref, R., M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk and R. H. Muller (2000). "'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption." *Colloids Surf B Biointerfaces* **18**(3-4): 301-313.

Griffiths, L., K. Binley, S. Iqball, O. Kan, P. Maxwell, P. Ratcliffe, C. Lewis, A. Harris, S. Kingsman and S. Naylor (2000). "The macrophage - a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia." *Gene Ther* **7**(3): 255-62.

Grothey, A. (2009). "A comparison of XELOX with FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer." *Nat Clin Pract Oncol* **6**(1): 10-1.

Gruenke, L. D., K. Konopka, M. Cadieu and L. Waskell (1995). "The stoichiometry of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyflurane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b5." *J Biol Chem* **270**(42): 24707-18.

Guengerich, F. P. (1991). "Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes." *J Biol Chem* **266**(16): 10019-22.

Guengerich, F. P. (2008). "Cytochrome p450 and chemical toxicology." *Chem Res Toxicol* **21**(1): 70-83.

Guengerich, F. P., M. V. Martin, Z. Guo and Y. J. Chun (1996). "Purification of functional recombinant P450s from bacteria." *Methods Enzymol* **272**: 35-44.

Gunge, N. (1983). "Yeast DNA plasmids." *Annu Rev Microbiol* **37**: 253-76.

Hackett, P. B., S. C. Ekker, D. A. Largaespada and R. S. McIvor (2005). "Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression." *Adv Genet* **54**: 189-232.

Hallenbeck, P. L., Y. N. Chang, C. Hay, D. Golightly, D. Stewart, J. Lin, S. Phipps and Y. L. Chiang (1999). "A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma." *Hum Gene Ther* **10**(10): 1721-33.

Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**(3): 353-64.

Hande, K. R. (1998). "Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor." *Eur J Cancer* **34**(10): 1514-21.

Handschin, C. and U. A. Meyer (2003). "Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors." *Pharmacol Rev* **55**(4): 649-73.

Hanna, I. H., J. R. Reed, F. P. Guengerich and P. F. Hollenberg (2000). "Expression of human cytochrome P450 2B6 in Escherichia coli: characterization of catalytic activity and expression levels in human liver." *Arch Biochem Biophys* **376**(1): 206-16.

Hannemann, F., A. Bichet, K. M. Ewen and R. Bernhardt (2007). "Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains." *Biochim Biophys Acta* **1770**(3): 330-44.

Harbers, E., N. K. Chaudhuri and C. Heidelberger (1959). "Studies on fluorinated pyrimidines. VIII. Further biochemical and metabolic investigations." *J Biol Chem* **234**(5): 1255-62.

Harlow, G. R. and J. R. Halpert (1996). "Mutagenesis study of Asp-290 in cytochrome P450 2B11 using a fusion protein with rat NADPH-cytochrome P450 reductase." *Arch Biochem Biophys* **326**(1): 85-92.

Harris, C. C. (1989). "Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair." *Carcinogenesis* **10**(9): 1563-6.

Hasemann, C. A., R. G. Kurumbail, S. S. Boddupalli, J. A. Peterson and J. Deisenhofer (1995). "Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures." *Structure* **3**(1): 41-62.

Hatakeyama, H., H. Akita, E. Ishida, K. Hashimoto, H. Kobayashi, T. Aoki, J. Yasuda, K. Obata, H. Kikuchi, T. Ishida, H. Kiwada and H. Harashima (2007). "Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes." *Int J Pharm* **342**(1-2): 194-200.

He, Y., Z. Luo, P. A. Klekotka, V. L. Burnett and J. R. Halpert (1994). "Structural determinants of cytochrome P450 2B1 specificity: evidence for five substrate recognition sites." *Biochemistry* **33**(14): 4419-24.

He, Y. A., C. A. Balfour, K. M. Kedzie and J. R. Halpert (1992). "Role of residue 478 as a determinant of the substrate specificity of cytochrome P450 2B1." *Biochemistry* **31**(38): 9220-6.

He, Y. Q., G. D. Szklarz and J. R. Halpert (1996). "Interconversion of the androstenedione hydroxylase specificities of cytochromes P450 2B4 and 2B5 upon simultaneous site-directed mutagenesis of four key substrate recognition residues." *Arch Biochem Biophys* **335**(1): 152-60.

Headlam, M. J., M. C. Wilce and R. C. Tuckey (2003). "The F-G loop region of cytochrome P450scc (CYP11A1) interacts with the phospholipid membrane." *Biochim Biophys Acta* **1617**(1-2): 96-108.

Hecht, S. M. (2000). "Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action." *J Nat Prod* **63**(1): 158-68.

Hecker, M. and V. Ullrich (1989). "On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis." *J Biol Chem* **264**(1): 141-50.

Hemenway, C. S. and J. Heitman (1996). "Immunosuppressant target protein FKBP12 is required for P-glycoprotein function in yeast." *J Biol Chem* **271**(31): 18527-34.

Heyer, W. D., X. Li, M. Rolfsmeier and X. P. Zhang (2006). "Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination?" *Nucleic Acids Res* **34**(15): 4115-25.

Higashi, Y., T. Hiromasa, A. Tanae, T. Miki, J. Nakura, T. Kondo, T. Ohura, E. Ogawa, K. Nakayama and Y. Fujii-Kuriyama (1991). "Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency." *J Biochem* **109**(4): 638-44.

Hilton, J. (1984). "Deoxyribonucleic acid crosslinking by 4-hydroperoxycyclophosphamide in cyclophosphamide-sensitive and -resistant L1210 cells." *Biochem Pharmacol* **33**(12): 1867-72.

Hiraga, K. and F. H. Arnold (2003). "General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis." *J Mol Biol* **330**(2): 287-96.

Hiroya, K., M. Ishigooka, T. Shimizu and M. Hatano (1992). "Role of Glu318 and Thr319 in the catalytic function of cytochrome P450d (P4501A2): effects of mutations on the methanol hydroxylation." *Faseb J* **6**(2): 749-51.

Hirsch, L. R., R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas and J. L. West (2003). "Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13549-54.

Hitchcock, A. L., J. A. Kahana and P. A. Silver (2005). The Uses of Green Fluorescent Protein in Yeast. In: M. Chalfie and S. Kain. *Green Fluorescent Protein : Properties, Applications, and Protocols*. 2nd edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, p. 179-201.

Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-74.

Hoffman, C. S. and F. Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli." *Gene* **57**(2-3): 267-72.

Hoffman, S. M., P. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez and H. W. Mohrenweiser (1995). "Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19." *J Mol Evol* **41**(6): 894-900.

Honma, W., W. Li, H. Liu, E. E. Scott and J. R. Halpert (2005). "Functional role of residues in the helix B' region of cytochrome P450 2B1." *Arch Biochem Biophys* **435**(1): 157-65.

Hsu, M. H., K. J. Griffin, Y. Wang, B. Kemper and E. F. Johnson (1993). "A single amino acid substitution confers progesterone 6 beta-hydroxylase activity to rabbit cytochrome P450 2C3." *J Biol Chem* **268**(10): 6939-44.

Hu-Lieskovan, S., J. D. Heidel, D. W. Bartlett, M. E. Davis and T. J. Triche (2005). "Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma." *Cancer Res* **65**(19): 8984-92.

Huang, W., W. A. Johnston, M. A. Hayes, J. J. De Voss and E. M. Gillam (2007). "A shuffled CYP2C library with a high degree of structural integrity and functional versatility." *Arch Biochem Biophys* **467**(2): 193-205.

Huang, Z., P. Roy and D. J. Waxman (2000). "Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide." *Biochem Pharmacol* **59**(8): 961-72.

Hubeek, I., E. Litvinova, G. J. Peters, R. Broekhuizen, E. G. Haarman, D. R. Huismans, J. Cloos, C. M. Zwaan, G. Fleischhack, U. Creutzig and G. J. Kaspers (2004). "The effect of G-CSF on the in vitro cytotoxicity of cytarabine and fludarabine in the FLAG combination in pediatric acute myeloid leukemia." *Int J Oncol* **25**(6): 1823-9.

Huber, B. E., E. A. Austin, C. A. Richards, S. T. Davis and S. S. Good (1994). "Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8302-6.

Hunt, S. (2001). "Technology evaluation: MetXia-P450, Oxford Biomedica." *Curr Opin Mol Ther* **3**(6): 595-8.

Ibeanu, G. C., B. I. Ghanayem, P. Linko, L. Li, L. G. Pederson and J. A. Goldstein (1996). "Identification of residues 99, 220, and 221 of human cytochrome P450 2C19 as key determinants of omeprazole activity." *J Biol Chem* **271**(21): 12496-501.

ICH (1997). *ICH Harmonized Tripartite Guideline. S2B. Genotoxicity : A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals*. International Cooperation on Harmonization(ICH).

Ichikawa, K. and T. Eki (2006). "A novel yeast-based reporter assay system for the sensitive detection of genotoxic agents mediated by a DNA damage-inducible LexA-GAL4 protein." *J Biochem* **139**(1): 105-12.

Ichikawa, T., W. P. Petros, S. M. Ludeman, J. Fangmeier, F. H. Hochberg, O. M. Colvin and E. A. Chiocca (2001). "Intraneoplastic polymer-based delivery of cyclophosphamide for intratumoral bioconversion by a replicating oncolytic viral vector." *Cancer Res* **61**(3): 864-8.

Imai, M., H. Shimada, Y. Watanabe, Y. Matsushima-Hibiya, R. Makino, H. Koga, T. Horiuchi and Y. Ishimura (1989). "Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(20): 7823-7.

Imai, Y. and M. Nakamura (1989). "Point mutations at threonine-301 modify substrate specificity of rabbit liver microsomal cytochromes P-450 (laurate (omega-1)-hydroxylase and testosterone 16 alpha-hydroxylase)." *Biochem Biophys Res Commun* **158**(3): 717-22.

Imaizumi, K., Y. Hasegawa, T. Kawabe, N. Emi, H. Saito, K. Naruse and K. Shimokata (1998). "Bystander tumoricidal effect and gap junctional communication in lung cancer cell lines." *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**(2): 205-12.

Ingelman-Sundberg, M. (2004). "Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future." *Trends Pharmacol Sci* **25**(4): 193-200.

Isin, E. M. and F. P. Guengerich (2007). "Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes." *Biochim Biophys Acta* **1770**(3): 314-29.

Iwasaki, M., Y. Yoshimura, S. Asahi, K. Saito, S. Sakai, S. Morita, O. Takenaka, T. Inoda, E. Kashiyama, A. Aoyama, T. Nakabayashi, S. Omori, T. Kuwabara, T. Izumi, K. Nakamura, K. Takanaka, Y. Nakayama, M. Takeuchi, H. Nakamura, S. Kametani, Y. Terauchi, T. Hashizume, S. Nagayama, T. Kume, M. Achira, H. Kawai, T. Kawashiro, A. Nakamura, Y. Nakai, A. Kagayama, T. Shiraga, T. Niwa, T. Yoshimura, J. Morita, F. Ohsawa, M. Tani, N. Osawa, K. Ida and K. Noguchi (2004). "Functional characterization of single nucleotide polymorphisms with amino acid substitution in CYP1A2, CYP2A6, and CYP2B6 found in the Japanese population." *Drug Metab Pharmacokinet* **19**(6): 444-52.

Iyer, A. K., G. Khaled, J. Fang and H. Maeda (2006). "Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting." *Drug Discov Today* **11**(17-18): 812-8.

Jabr-Milane, L., L. van Vlerken, H. Devalapally, D. Shenoy, S. Komareddy, M. Bhavsar and M. Amiji (2008). "Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes." *J Control Release* **130**(2): 121-8.

Jacobson-Kram, D. and J. F. Contrera (2007). "Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part I: Early screening for potential human mutagens." *Toxicol Sci* **96**(1): 16-20.

Jain, K. K. (2007). "Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics." *Clin Chem* **53**(11): 2002-9.

Jean, P., J. Pothier, P. M. Dansette, D. Mansuy and A. Viari (1997). "Automated multiple analysis of protein structures: application to homology modeling of cytochromes P450." *Proteins* **28**(3): 388-404.

Jelinsky, S. A. and L. D. Samson (1999). "Global response of Saccharomyces cerevisiae to an alkylating agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1486-91.

Jezequel, L., J. Loeper and D. Pompon (2008). "Sequence-independent construction of ordered combinatorial libraries with predefined crossover points." *Biotechniques* **45**(5): 523-32.

Jinno, H., T. Tanaka-Kagawa, A. Ohno, Y. Makino, E. Matsushima, N. Hanioka and M. Ando (2003). "Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants." *Drug Metab Dispos* **31**(4): 398-403.

John, S. S., A. L. Zietman, W. U. Shipley and M. G. Harisinghani (2008). "Newer imaging modalities to assist with target localization in the radiation treatment of prostate cancer and possible lymph node metastases." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **71**(1 Suppl): S43-7.

Johnston, W. A., W. Huang, J. J. De Voss, M. A. Hayes and E. M. Gillam (2007). "A shuffled CYP1A library shows both structural integrity and functional diversity." *Drug Metab Dispos* **35**(12): 2177-85.

Joo, H., Z. Lin and F. H. Arnold (1999). "Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation." *Nature* **399**(6737): 670-3.

Jounaidi, Y., C. S. Chen, G. J. Veal and D. J. Waxman (2006). "Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11." *Mol Cancer Ther* **5**(3): 541-55.

Jounaidi, Y., J. E. Hecht and D. J. Waxman (1998). "Retroviral transfer of human cytochrome P450 genes for oxazaphosphorine-based cancer gene therapy." *Cancer Res* **58**(19): 4391-401.

Jounaidi, Y. and D. J. Waxman (2001). "Frequent, moderate-dose cyclophosphamide administration improves the efficacy of cytochrome P-450/cytochrome P-450 reductase-based cancer gene therapy." *Cancer Res* **61**(11): 4437-44.

Jounaidi, Y. and D. J. Waxman (2004). "Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of P450 prodrug-activation genes for cancer therapy." *Cancer Res* **64**(1): 292-303.

Jovanovic, T., R. Farid, R. A. Friesner and A. E. McDermott (2005). "Thermal equilibrium of high- and low-spin forms of cytochrome P450 BM-3: repositioning of the substrate?" *J Am Chem Soc* **127**(39): 13548-52.

Jovanovic, T. and A. E. McDermott (2005). "Observation of ligand binding to cytochrome P450 BM-3 by means of solid-state NMR spectroscopy." *J Am Chem Soc* **127**(40): 13816-21.

Kalhorn, T. F., W. N. Howald, S. Cole, B. Phillips, J. Wang, J. T. Slattery and J. S. McCune (2006). "Rapid quantitation of cyclophosphamide metabolites in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **835**(1-2): 105-13.

Kan, O., L. Griffiths, D. Baban, S. Iqball, M. Uden, H. Spearman, J. Slingsby, T. Price, M. Esapa, S. Kingsman, A. Kingsman, A. Slade and S. Naylor (2001). "Direct retroviral delivery of human cytochrome P450 2B6 for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer." *Cancer Gene Ther* **8**(7): 473-82.

Kan, O., S. Kingsman and S. Naylor (2002). "Cytochrome P450-based cancer gene therapy: current status." *Expert Opin Biol Ther* **2**(8): 857-68.

Karle, P., P. Muller, R. Renz, R. Jesnowski, R. Saller, K. von Rombs, H. Nizze, S. Liebe, W. H. Gunzburg, B. Salmons and M. Lohr (1998). "Intratumoral injection of encapsulated cells producing an oxazaphosphorine activating cytochrome P450 for targeted chemotherapy." *Adv Exp Med Biol* **451**: 97-106.

Karran, P. and N. Attard (2008). "Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer." *Nat Rev Cancer* **8**(1): 24-36.

Katagiri, M., B. N. Ganguli and I. C. Gunsalus (1968). "A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation." *J Biol Chem* **243**(12): 3543-6.

Kelly, D. and J. M. Parry (1983). "Metabolic activation of cytochrome P-450/P-448 in the yeast Saccharomyces cerevisiae." *Mutat Res* **108**(1-3): 147-59.

Keohavong, P. and W. G. Thilly (1989). "Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9253-7.

Kerbel, R. and J. Folkman (2002). "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 727-39.

Kievit, E., M. K. Nyati, E. Ng, L. D. Stegman, J. Parsels, B. D. Ross, A. Rehemtulla and T. S. Lawrence (2000). "Yeast cytosine deaminase improves radiosensitization and bystander effect by 5-fluorocytosine of human colorectal cancer xenografts." *Cancer Res* **60**(23): 6649-55.

King, C. L., S. K. Wong and T. L. Loo (1984). "Alkylation of DNA by the new anticancer agent 3,6-diaziridinyl-2,5-bis(carboethoxyamino)-1,4-benzoquinone (AZQ)." *Eur J Cancer Clin Oncol* **20**(2): 261-4.

Kirchheiner, J., C. Klein, I. Meineke, J. Sasse, U. M. Zanger, T. E. Murdter, I. Roots and J. Brockmoller (2003). "Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6." *Pharmacogenetics* **13**(10): 619-26.

Kirpotin, D. B., D. C. Drummond, Y. Shao, M. R. Shalaby, K. Hong, U. B. Nielsen, J. D. Marks, C. C. Benz and J. W. Park (2006). "Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models." *Cancer Res* **66**(13): 6732-40.

Klingenberg, M. (1958). "Pigments of rat liver microsomes." *Arch Biochem Biophys* **75**(2): 376-86.

Knight, A. W. (2004). "Using yeast to shed light on DNA damaging toxins and irradiation." *Analyst* **129**(10): 866-9.

Knight, A. W., N. Billinton, P. A. Cahill, A. Scott, J. S. Harvey, K. J. Roberts, D. J. Tweats, P. O. Keenan and R. M. Walmsley (2007). "An analysis of results from 305 compounds tested with the yeast RAD54-GFP genotoxicity assay (GreenScreen GC)-including relative predictivity of regulatory tests and rodent carcinogenesis and performance with autofluorescent and coloured compounds." *Mutagenesis* **22**(6): 409-16.

Kolodner, R. D. and G. T. Marsischky (1999). "Eukaryotic DNA mismatch repair." *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 89-96.

Korkmaz, A., T. Topal and S. Oter (2007). "Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation." *Cell Biol Toxicol* **23**(5): 303-12.

Kranendonk, M., C. W. Fisher, R. Roda, F. Carreira, P. Theisen, A. Laires, J. Rueff, N. P. Vermeulen and R. W. Estabrook (1999). "Escherichia coli MTC, a NADPH cytochrome P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450: comparison of three types of expression systems." *Mutat Res* **439**(2): 287-300.

Krasnici, S., A. Werner, M. E. Eichhorn, M. Schmitt-Sody, S. A. Pahernik, B. Sauer, B. Schulze, M. Teifel, U. Michaelis, K. Naujoks and M. Dellian (2003). "Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels." *Int J Cancer* **105**(4): 561-7.

Kumar, S. and J. R. Halpert (2005). "Use of directed evolution of mammalian cytochromes P450 for investigating the molecular basis of enzyme function and generating novel biocatalysts." *Biochem Biophys Res Commun* **338**(1): 456-64.

Kumar, S., E. E. Scott, H. Liu and J. R. Halpert (2003). "A rational approach to Re-engineer cytochrome P450 2B1 regioselectivity based on the crystal structure of cytochrome P450 2C5." *J Biol Chem* **278**(19): 17178-84.

Kurtovic, S., A. Runarsdottir, L. O. Emren, A. K. Larsson and B. Mannervik (2007). "Multivariate-activity mining for molecular quasi-species in a glutathione transferase mutant library." *Protein Eng Des Sel* **20**(5): 243-56.

Laden, F., N. Ishibe, S. E. Hankinson, M. S. Wolff, D. M. Gertig, D. J. Hunter and K. T. Kelsey (2002). "Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1, and breast cancer risk in the Nurses' Health Study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(12): 1560-5.

Lai, L. W., J. M. Ducore and B. S. Rosenstein (1987). "DNA-protein crosslinking in normal human skin fibroblasts exposed to solar ultraviolet wavelengths." *Photochem Photobiol* **46**(1): 143-6.

Lammers, T., W. E. Hennink and G. Storm (2008). "Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice." *Br J Cancer* **99**(3): 392-7.

Lammers, T., P. Peschke, R. Kuhnlein, V. Subr, K. Ulbrich, P. Huber, W. Hennink and G. Storm (2006). "Effect of intratumoral injection on the biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer-based drug delivery systems." *Neoplasia* **8**(10): 788-95.

Lammers, T., V. Subr, P. Peschke, R. Kuhnlein, W. E. Hennink, K. Ulbrich, F. Kiessling, M. Heilmann, J. Debus, P. E. Huber and G. Storm (2008). "Image-guided and passively tumour-targeted polymeric nanomedicines for radiochemotherapy." *Br J Cancer* **99**(6): 900-10.

Landwehr, M., M. Carbone, C. R. Otey, Y. Li and F. H. Arnold (2007). "Diversification of catalytic function in a synthetic family of chimeric cytochrome p450s." *Chem Biol* **14**(3): 269-78.

Lane, D. P. and S. Lain (2002). "Therapeutic exploitation of the p53 pathway." *Trends Mol Med* **8**(4 Suppl): S38-42.

Lang, T., K. Klein, J. Fischer, A. K. Nussler, P. Neuhaus, U. Hofmann, M. Eichelbaum, M. Schwab and U. M. Zanger (2001). "Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver." *Pharmacogenetics* **11**(5): 399-415.

Lang, T., K. Klein, T. Richter, A. Zibat, R. Kerb, M. Eichelbaum, M. Schwab and U. M. Zanger (2004). "Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles." *J Pharmacol Exp Ther* **311**(1): 34-43.

Larsson, A. K., L. O. Emren, W. G. Bardsley and B. Mannervik (2004). "Directed enzyme evolution guided by multidimensional analysis of substrate-activity space." *Protein Eng Des Sel* **17**(1): 49-55.

Laughton, C. A., S. Neidle, M. J. Zvelebil and M. J. Sternberg (1990). "A molecular model for the enzyme cytochrome P450(17 alpha), a major target for the chemotherapy of prostatic cancer." *Biochem Biophys Res Commun* **171**(3): 1160-7.

Lee, C. A., S. H. Kadwell, T. A. Kost and C. J. Serabjit-Singh (1995). "CYP3A4 expressed by insect cells infected with a recombinant baculovirus containing both CYP3A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase is catalytically similar to human liver microsomal CYP3A4." *Arch Biochem Biophys* **319**(1): 157-67.

Lee, K. H., H. Piao, B. R. Son, D. S. Heo, N. K. Kim and S. T. Kim (2004). "Herpes simplex virus thymidine kinase and granulocyte macrophage colony-stimulating factor combination gene therapy in a murine CT26 cell colon cancer model." *Cancer Gene Ther* **11**(8): 570-6.

Lehmann, A. R. and E. M. Taylor (2001). Conservation of Eukaryotic DNA Repair Mechanisms. In: J.A. Nickoloff and M.F. Hoekstra. *DNA damage and Repair*. Vol. III. Totawa, NJ: Humana Press, p. 377-401.

Lewis, D. F., M. Dickins, B. G. Lake, P. J. Eddershaw, M. H. Tarbit and P. S. Goldfarb (1999). "Molecular modelling of the human cytochrome P450 isoform CYP2A6 and investigations of CYP2A substrate selectivity." *Toxicology* **133**(1): 1-33.

Lewis, D. F., M. Dickins, B. G. Lake and P. S. Goldfarb (2003). "Investigation of enzyme selectivity in the human CYP2C subfamily: homology modelling of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 from the CYP2C5 crystallographic template." *Drug Metabol Drug Interact* **19**(4): 257-85.

Lewis, D. F., M. Dickins, R. J. Weaver, P. J. Eddershaw, P. S. Goldfarb and M. H. Tarbit (1998). "Molecular modelling of human CYP2C subfamily enzymes CYP2C9 and CYP2C19: rationalization of substrate specificity and site-directed mutagenesis experiments in the CYP2C subfamily." *Xenobiotica* **28**(3): 235-68.

Lewis, D. F., B. G. Lake, M. Dickins, P. J. Eddershaw, M. H. Tarbit and P. S. Goldfarb (1999). "Molecular modelling of CYP2B6, the human CYP2B isoform, by homology with the substrate-bound CYP102 crystal structure: evaluation of CYP2B6 substrate characteristics, the cytochrome b5 binding site and comparisons with CYP2B1 and CYP2B4." *Xenobiotica* **29**(4): 361-93.

Lewis, D. F., B. G. Lake, M. Dickins and P. S. Goldfarb (2002). "Molecular modelling of CYP2B6 based on homology with the CYP2C5 crystal structure: analysis of enzyme-substrate interactions." *Drug Metabol Drug Interact* **19**(2): 115-35.

Lewis, D. F., B. G. Lake, Y. Ito and P. Anzenbacher (2006). "Quantitative structure-activity relationships (QSARs) within cytochromes P450 2B (CYP2B) subfamily enzymes: the importance of lipophilicity for binding and metabolism." *Drug Metabol Drug Interact* **21**(3-4): 213-31.

Lewis, D. F., E. Watson and B. G. Lake (1998). "Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics." *Mutat Res* **410**(3): 245-70.

Li, C. and R. M. Evans (1997). "Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility." *Nucleic Acids Res* **25**(20): 4165-6.

Li, Q. S., J. Ogawa, R. D. Schmid and S. Shimizu (2001). "Residue size at position 87 of cytochrome P450 BM-3 determines its stereoselectivity in propylbenzene and 3-chlorostyrene oxidation." *FEBS Lett* **508**(2): 249-52.

Li, Y., R. C. Millikan, D. A. Bell, L. Cui, C. K. Tse, B. Newman and K. Conway (2005). "Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms, and breast cancer risk among African American women and white women in North Carolina: a population-based case-control study." *Breast Cancer Res* **7**(1): R12-8.

Lichtenberg-Frate, H., M. Schmitt, G. Gellert and J. Ludwig (2003). "A yeast-based method for the detection of cyto and genotoxicity." *Toxicol. In Vitro* **17**(5-6): 709-16.

Lieber, M. R., Y. Ma, U. Pannicke and K. Schwarz (2003). "Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(9): 712-20.

Lindberg, R. L. and M. Negishi (1989). "Alteration of mouse cytochrome P450coh substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue." *Nature* **339**(6226): 632-4.

Liska, D. J. (1998). "The detoxification enzyme systems." *Altern Med Rev* **3**(3): 187-98.

Liu, Y., H. Miyoshi and M. Nakamura (2007). "Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles." *Int J Cancer* **120**(12): 2527-37.

Ljungman, M. and D. P. Lane (2004). "Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage." *Nat Rev Cancer* **4**(9): 727-37.

Ljungman, M. and F. Zhang (1996). "Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis." *Oncogene* **13**(4): 823-31.

Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. E. Darnell (1999). *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W.H.Freeman&Co.

Loeper, J., V. Descatoire, M. Maurice, P. Beaune, J. Belghiti, D. Houssin, F. Ballet, G. Feldmann, F. P. Guengerich and D. Pessayre (1993). "Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies." *Gastroenterology* **104**(1): 203-16.

Loeper, J., B. Louerat-Oriou, C. Duport and D. Pompon (1998). "Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent." *Mol Pharmacol* **54**(1): 8-13.

Lohr, M., A. Hoffmeyer, J. Kroger, M. Freund, J. Hain, A. Holle, P. Karle, W. T. Knofel, S. Liebe, P. Muller, H. Nizze, M. Renner, R. M. Saller, T. Wagner, K. Hauenstein, W. H. Gunzburg and B. Salmons (2001). "Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma." *Lancet* **357**(9268): 1591-2.

Lohr, M., P. Muller, P. Karle, J. Stange, S. Mitzner, R. Jesnowski, H. Nizze, B. Nebe, S. Liebe, B. Salmons and W. H. Gunzburg (1998). "Targeted chemotherapy by intratumour injection of encapsulated cells engineered to produce CYP2B1, an ifosfamide activating cytochrome P450." *Gene Ther* **5**(8): 1070-8.

Loo, C., A. Lin, L. Hirsch, M. H. Lee, J. Barton, N. Halas, J. West and R. Drezek (2004). "Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer." *Technol Cancer Res Treat* **3**(1): 33-40.

Lopez, S., M. Prieto, J. Dijkstra, M. S. Dhanoa and J. France (2004). "Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth." *Int J Food Microbiol* **96**(3): 289-300.

Loughran, P. A., L. J. Roman, A. E. Aitken, R. T. Miller and B. S. Masters (2000). "Identification of unique amino acids that modulate CYP4A7 activity." *Biochemistry* **39**(49): 15110-20.

Lu, A. Y. and M. J. Coon (1968). "Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes." *J Biol Chem* **243**(6): 1331-2.

Lu, A. Y., W. Levin, S. B. West, M. Jacobson, D. Ryan, R. Kuntzman and A. H. Conney (1973). "Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. VI. Different substrate specificities of the cytochrome P450 fractions from control and phenobarbital-treated rats." *J Biol Chem* **248**(2): 456-60.

Ludemann, S. K., V. Lounnas and R. C. Wade (2000). "How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms." *J Mol Biol* **303**(5): 797-811.

Ludemann, S. K., V. Lounnas and R. C. Wade (2000). "How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways." *J Mol Biol* **303**(5): 813-30.

Lutz, S., M. Ostermeier, G. L. Moore, C. D. Maranas and S. J. Benkovic (2001). "Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11248-53.

Ma, H., S. Kunes, P. J. Schatz and D. Botstein (1987). "Plasmid construction by homologous recombination in yeast." *Gene* **58**(2-3): 201-16.

Maanen, M. J., C. J. Smeets and J. H. Beijnen (2000). "Chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of N,N',N" -triethylenethiophosphoramide (ThioTEPA)." *Cancer Treat Rev* **26**(4): 257-68.

Maccubbin, A. E., L. Caballes, J. M. Riordan, D. H. Huang and H. L. Gurtoo (1991). "A cyclophosphamide/DNA phosphoester adduct formed in vitro and in vivo." *Cancer Res* **51**(3): 886-92.

Manome, Y., P. Y. Wen, L. Chen, T. Tanaka, Y. Dong, M. Yamazoe, A. Hirshowitz, D. W. Kufe and H. A. Fine (1996). "Gene therapy for malignant gliomas using replication incompetent retroviral and adenoviral vectors encoding the cytochrome P450 2B1 gene together with cyclophosphamide." *Gene Ther* **3**(6): 513-20.

Mansuy, D., P. Battioni and J. P. Battioni (1989). "Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases." *Eur J Biochem* **184**(2): 267-85.

Marshall, J., H. Chen, D. Yang, M. Figueira, K. B. Bouker, Y. Ling, M. Lippman, S. R. Frankel and D. F. Hayes (2004). "A phase I trial of a Bcl-2 antisense (G3139) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors." *Ann Oncol* **15**(8): 1274-83.

Marti-Renom, M. A., A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo and A. Sali (2000). "Comparative protein structure modeling of genes and genomes." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 291-325.

Maruyama, K., N. Takahashi, T. Tagawa, K. Nagaike and M. Iwatsuru (1997). "Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo." *FEBS Lett* **413**(1): 177-80.

McCarthy, H. O., J. Worthington, E. Barrett, E. Cosimo, M. Boyd, R. J. Mairs, C. Ward, S. R. McKeown, D. G. Hirst and T. Robson (2007). "p21((WAF1))-mediated transcriptional targeting of inducible nitric oxide synthase gene therapy sensitizes tumours to fractionated radiotherapy." *Gene Ther* **14**(3): 246-55.

McMahon, S. J., M. H. Mendenhall, S. Jain and F. Currell (2008). "Radiotherapy in the presence of contrast agents: a general figure of merit and its application to gold nanoparticles." *Phys Med Biol* **53**(20): 5635-51.

Meharenna, Y. T., K. E. Slessor, S. M. Cavaignac, T. L. Poulos and J. J. De Voss (2008). "The critical role of substrate-protein hydrogen bonding in the control of regioselective hydroxylation in p450cin." *J Biol Chem* **283**(16): 10804-12.

Mello, C. C., J. M. Kramer, D. Stinchcomb and V. Ambros (1991). "Efficient gene transfer in C.elegans: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences." *Embo J* **10**(12): 3959-70.

Menzel, R., T. Bogaert and R. Achazi (2001). "A systematic gene expression screen of Caenorhabditis elegans cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible." *Arch Biochem Biophys* **395**(2): 158-68.

Mesnil, M. and H. Yamasaki (2000). "Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication." *Cancer Res* **60**(15): 3989-99.

Meyer, M. M., J. J. Silberg, C. A. Voigt, J. B. Endelman, S. L. Mayo, Z. G. Wang and F. H. Arnold (2003). "Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination." *Protein Sci* **12**(8): 1686-93.

Meyer, U. A. and U. M. Zanger (1997). "Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 269-96.

Mezard, C., D. Pompon and A. Nicolas (1992). "Recombination between similar but not identical DNA sequences during yeast transformation occurs within short stretches of identity." *Cell* **70**(4): 659-70.

Miles, C. S., T. W. Ost, M. A. Noble, A. W. Munro and S. K. Chapman (2000). "Protein engineering of cytochromes P-450." *Biochim Biophys Acta* **1543**(2): 383-407.

Miles, J. S., A. W. McLaren, F. J. Gonzalez and C. R. Wolf (1990). "Alternative splicing in the human cytochrome P450IIB6 gene: use of a cryptic exon within intron 3 and splice acceptor site within exon 4." *Nucleic Acids Res* **18**(1): 189.

Miller, W. R. (2003). "Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer." *Semin Oncol* **30**(4 Suppl 14): 3-11.

Miller, W. R., T. J. Anderson, S. White, A. Larionov, J. Murray, D. Evans, A. Krause and J. M. Dixon (2005). "Aromatase inhibitors: cellular and molecular effects." *J Steroid Biochem Mol Biol* **95**(1-5): 83-9.

Mimura, M., T. Baba, H. Yamazaki, S. Ohmori, Y. Inui, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich and T. Shimada (1993). "Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes." *Drug Metab Dispos* **21**(6): 1048-56.

Mizoguchi, H., M. Orlowski, S. Wilk and J. P. Green (1979). "gamma-Glutamyl DOPA and gamma-glutamyl dopamine: effect on plasma glucose levels." *Eur J Pharmacol* **57**(2-3): 239-45.

Modi, S., W. U. Primrose, J. M. Boyle, C. F. Gibson, L. Y. Lian and G. C. Roberts (1995). "NMR studies of substrate binding to cytochrome P450 BM3: comparisons to cytochrome P450 cam." *Biochemistry* **34**(28): 8982-8.

Mollinedo, F. and C. Gajate (2003). "Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis." *Apoptosis* **8**(5): 413-50.

Monaco, M., R. Dominici, P. Barisano, G. Di Palermo, A. Galli and G. Bronzetti (1992). "Mutagenicity of methyl methanesulfonate and cyclophosphamide in resting and growing Saccharomyces cerevisiae D7 cells." *Mutat Res* **282**(4): 235-9.

Moolten, F. L. (1986). "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy." *Cancer Res* **46**(10): 5276-81.

Mortelmans, K. and E. Zeiger (2000). "The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay." *Mutat Res* **455**(1-2): 29-60.

Mullen, C. A., L. Anderson, K. Woods, M. Nishino and D. Petropoulos (1998). "Ganciclovir chemoablation of herpes thymidine kinase suicide gene-modified tumors produces tumor necrosis and induces systemic immune responses." *Hum Gene Ther* **9**(14): 2019-30.

Muller, H. J. (1927). "Artificial Transmutation of the Gene." *Science* **66**(1699): 84-87.

Muller, I., D. Niethammer and G. Bruchelt (1998). "Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review)." *Int J Mol Med* **1**(2): 491-4.

Nakayama, K., A. Puchkaev and I. A. Pikuleva (2001). "Membrane binding and substrate access merge in cytochrome P450 7A1, a key enzyme in degradation of cholesterol." *J Biol Chem* **276**(33): 31459-65.

Narhi, L. O. and A. J. Fulco (1986). "Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in Bacillus megaterium." *J Biol Chem* **261**(16): 7160-9.

Narhi, L. O. and A. J. Fulco (1987). "Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in Bacillus megaterium." *J Biol Chem* **262**(14): 6683-90.

Nass, R. and I. Hamza (2007). "The Nematode C. elegans as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters." *Current Protocols in Toxicology* **Supplement 31**: 1.9.1-1.9.18.

Natarajan, A. T. and F. Palitti (2008). "DNA repair and chromosomal alterations." *Mutat Res* **657**(1): 3-7.

Nebert, D. W., M. Adesnik, M. J. Coon, R. W. Estabrook, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson, B. Kemper, W. Levin and et al. (1987). "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." *DNA* **6**(1): 1-11.

Nebert, D. W. and M. Z. Dieter (2000). "The evolution of drug metabolism." *Pharmacology* **61**(3): 124-35.

Nebert, D. W., D. R. Nelson, M. Adesnik, M. J. Coon, R. W. Estabrook, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson, B. Kemper and et al. (1989). "The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci." *DNA* **8**(1): 1-13.

Nebert, D. W., D. R. Nelson, M. J. Coon, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, Y. Fujii-Kuriyama, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson and et al. (1991). "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature." *DNA Cell Biol* **10**(1): 1-14.

Nelson, D. R. (1999). "Cytochrome P450 and the individuality of species." *Arch Biochem Biophys* **369**(1): 1-10.

Nelson, D. R., T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh and et al. (1993). "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." *DNA Cell Biol* **12**(1): 1-51.

Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus and D. W. Nebert (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." *Pharmacogenetics* **6**(1): 1-42.

Nelson, D. R. and H. W. Strobel (1988). "On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 proteins." *J Biol Chem* **263**(13): 6038-50.

Nelson, D. R., D. C. Zeldin, S. M. Hoffman, L. J. Maltais, H. M. Wain and D. W. Nebert (2004). "Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants." *Pharmacogenetics* **14**(1): 1-18.

Nguyen, T. A. (2007). Relations structure-fonction dans la superfamille des cytochromes P450. Etudes bioinformatiques. *Thèse de doctorat*. Orsay: Université Paris Sud 11, 354 p.

Nguyen, T. A., M. Tychopoulos, F. Bichat, C. Zimmermann, J. P. Flinois, M. Diry, E. Ahlberg, M. Delaforge, L. Corcos, P. Beaune, P. Dansette, F. Andre and I. de Waziers (2008). "Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo." *Mol Pharmacol* **73**(4): 1122-33.

Niculescu-Duvaz, I. and C. J. Springer (2005). "Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy." *Mol Biotechnol* **30**(1): 71-88.

Niemeyer, U., J. Engel, G. Scheffler, K. Molge, D. Sauerbier and W. Weigert (1984). "Chemical characterization of ASTA Z 7557 (INN mafosfamide, CIS-4-sulfoethylthio-cyclophosphamide), a stable derivative of 4-hydroxy-cyclophosphamide." *Invest New Drugs* **2**(2): 133-9.

Niranjan, B. G., H. Raza, R. M. Shayiq, C. R. Jefcoate and N. G. Avadhani (1988). "Hepatic mitochondrial cytochrome P-450 system. Identification and characterization of a precursor form of mitochondrial cytochrome P-450 induced by 3-methylcholanthrene." *J Biol Chem* **263**(1): 575-80.

Nisato, R. E., J. C. Tille, A. Jonczyk, S. L. Goodman and M. S. Pepper (2003). "alphav beta 3 and alphav beta 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro." *Angiogenesis* **6**(2): 105-19.

Nolan, D., E. Phillips and S. Mallal (2006). "Efavirenz and CYP2B6 polymorphism: implications for drug toxicity and resistance." *Clin Infect Dis* **42**(3): 408-10.

O'Neal, D. P., L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne and J. L. West (2004). "Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles." *Cancer Lett* **209**(2): 171-6.

Ogur, M., R. St. John and S. Nagai (1957). "Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast." *Science* **125**(3254): 928-9.

Omura, T. and R. Sato (1962). "A new cytochrome in liver microsomes." *J Biol Chem* **237**: 1375-6.

Omura, T. and R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature." *J Biol Chem* **239**: 2370-8.

Omura, T. and R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. Ii. Solubilization, Purification, and Properties." *J Biol Chem* **239**: 2379-85.

Orr-Weaver, T. L. and J. W. Szostak (1983). "Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(14): 4417-21.

Osaki, T., Y. Tanio, I. Tachibana, S. Hosoe, T. Kumagai, I. Kawase, S. Oikawa and T. Kishimoto (1994). "Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene." *Cancer Res* **54**(20): 5258-61.

Ostermeier, M. (2007). "Beyond cataloging the Library of Babel." *Chem Biol* **14**(3): 237-8.

Ostermeier, M., J. H. Shim and S. J. Benkovic (1999). "A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology." *Nat Biotechnol* **17**(12): 1205-9.

Otey, C. R., M. Landwehr, J. B. Endelman, K. Hiraga, J. D. Bloom and F. H. Arnold (2006). "Structure-guided recombination creates an artificial family of cytochromes P450." *PLoS Biol* **4**(5): e112.

Otey, C. R., J. J. Silberg, C. A. Voigt, J. B. Endelman, G. Bandara and F. H. Arnold (2004). "Functional evolution and structural conservation in chimeric cytochromes p450: calibrating a structure-guided approach." *Chem Biol* **11**(3): 309-18.

Otsuka, H., Y. Nagasaki and K. Kataoka (2003). "PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications." *Adv Drug Deliv Rev* **55**(3): 403-19.

Otyepka, M., J. Skopalik, E. Anzenbacherova and P. Anzenbacher (2007). "What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date?" *Biochim Biophys Acta* **1770**(3): 376-89.

Paine, M. F., N. Scrutton, A. W. Munro, A. Gutierrez, G. Roberts and C. R. Wolf (2005). Electron transfer partners of cytochromes P450. In: P.R. Ortiz de Montellano. *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism and Biochemistry*. 3rd edition. New York: Springer, p. 115-148.

Parikh, A., P. D. Josephy and F. P. Guengerich (1999). "Selection and characterization of human cytochrome P450 1A2 mutants with altered catalytic properties." *Biochemistry* **38**(17): 5283-9.

Pascoe, J. M. and J. J. Roberts (1974). "Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds." *Biochem Pharmacol* **23**(9): 1359-65.

Pascoe, J. M. and J. J. Roberts (1974). "Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. II. Interstrand cross-linking of isolated and cellular DNA by platinum(IV) compounds." *Biochem Pharmacol* **23**(9): 1345-57.

Pauwels, E. K. and P. Erba (2007). "Towards the use of nanoparticles in cancer therapy and imaging." *Drug News Perspect* **20**(4): 213-20.

Pawlik, T. M., H. Nakamura, J. T. Mullen, H. Kasuya, S. S. Yoon, S. Chandrasekhar, E. A. Chiocca and K. K. Tanabe (2002). "Prodrug bioactivation and oncolysis of diffuse liver metastases by a herpes simplex virus 1 mutant that expresses the CYP2B1 transgene." *Cancer* **95**(5): 1171-81.

Pawlik, T. M., H. Nakamura, S. S. Yoon, J. T. Mullen, S. Chandrasekhar, E. A. Chiocca and K. K. Tanabe (2000). "Oncolysis of diffuse hepatocellular carcinoma by intravascular administration of a replication-competent, genetically engineered herpesvirus." *Cancer Res* **60**(11): 2790-5.

Pelletier, J. N. (2001). "A RACHITT for our toolbox." *Nat Biotechnol* **19**(4): 314-5.

Pernecky, S. J., J. R. Larson, R. M. Philpot and M. J. Coon (1993). "Expression of truncated forms of liver microsomal P450 cytochromes 2B4 and 2E1 in Escherichia coli: influence of NH2-terminal region on localization in cytosol and membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7): 2651-5.

Peterson, C. L. (1996). "Multiple SWItches to turn on chromatin?" *Curr Opin Genet Dev* **6**(2): 171-5.

Pochapsky, T. C., T. A. Lyons, S. Kazanis, T. Arakaki and G. Ratnaswamy (1996). "A structure-based model for cytochrome P450cam-putidaredoxin interactions." *Biochimie* **78**(8-9): 723-33.

Podust, L. M., T. L. Poulos and M. R. Waterman (2001). "Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis in complex with azole inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3068-73.

Pompon, D., J. C. Gautier, A. Perret, G. Truan and P. Urban (1997). "Simulation of human xenobiotic metabolism in microorganisms. Yeast a good compromise between E. coli and human cells." *J Hepatol* **26 Suppl 2**: 81-5.

Pompon, D., B. Louerat, A. Bronine and P. Urban (1996). "Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments." *Methods Enzymol* **272**: 51-64.

Pompon, D. and A. Nicolas (1989). "Protein engineering by cDNA recombination in yeasts: shuffling of mammalian cytochrome P-450 functions." *Gene* **83**(1): 15-24.

Poulos, T. L., B. C. Finzel, I. C. Gunsalus, G. C. Wagner and J. Kraut (1985). "The 2.6-A crystal structure of Pseudomonas putida cytochrome P-450." *J Biol Chem* **260**(30): 16122-30.

Poulos, T. L., B. C. Finzel and A. J. Howard (1987). "High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam." *J Mol Biol* **195**(3): 687-700.

Pourquier, P. (2006). "DNA repair, a potential target for anticancer drug development." *Bull Cancer* **93**: 124-44.

Povirk, L. F. and D. E. Shuker (1994). "DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards." *Mutat Res* **318**(3): 205-26.

Pritchard, L., D. Corne, D. Kell, J. Rowland and M. Winson (2005). "A general model of error-prone PCR." *J Theor Biol* **234**(4): 497-509.

Raag, R., H. Li, B. C. Jones and T. L. Poulos (1993). "Inhibitor-induced conformational change in cytochrome P-450CAM." *Biochemistry* **32**(17): 4571-8.

Rak, J., J. L. Yu, G. Klement and R. S. Kerbel (2000). "Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth." *J Investig Dermatol Symp Proc* **5**(1): 24-33.

Ramesh, R., A. J. Marrogi, A. Munshi, C. N. Abboud and S. M. Freeman (1996). "In vivo analysis of the 'bystander effect': a cytokine cascade." *Exp Hematol* **24**(7): 829-38.

Ran, S., A. Downes and P. E. Thorpe (2002). "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels." *Cancer Res* **62**(21): 6132-40.

Rao, S., L. He, S. Chakravarty, I. Ojima, G. A. Orr and S. B. Horwitz (1999). "Characterization of the Taxol binding site on the microtubule. Identification of Arg(282) in beta-tubulin as the site of photoincorporation of a 7-benzophenone analogue of Taxol." *J Biol Chem* **274**(53): 37990-4.

Raskopf, E., A. Vogt, T. Sauerbruch and V. Schmitz (2008). "siRNA targeting VEGF inhibits hepatocellular carcinoma growth and tumor angiogenesis in vivo." *J Hepatol* **49**(6): 977-84.

Raucy, J. L. and S. W. Allen (2001). "Recent advances in P450 research." *Pharmacogenomics J* **1**(3): 178-86.

Ravindranathan, K. P., E. Gallicchio, R. A. Friesner, A. E. McDermott and R. M. Levy (2006). "Conformational equilibrium of cytochrome P450 BM-3 complexed with N-palmitoylglycine: a replica exchange molecular dynamics study." *J Am Chem Soc* **128**(17): 5786-91.

Relf, M., S. LeJeune, P. A. Scott, S. Fox, K. Smith, R. Leek, A. Moghaddam, R. Whitehouse, R. Bicknell and A. L. Harris (1997). "Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis." *Cancer Res* **57**(5): 963-9.

Rigg, A. and K. Sikora (1997). "Genetic prodrug activation therapy." *Mol Med Today* **3**(8): 359-66.

Roberts, G. A., A. Celik, D. J. Hunter, T. W. Ost, J. H. White, S. K. Chapman, N. J. Turner and S. L. Flitsch (2003). "A self-sufficient cytochrome p450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center." *J Biol Chem* **278**(49): 48914-20.

Roberts, J. J. and J. M. Pascoe (1972). "Cross-linking of complementary strands of DNA in mammalian cells by antitumour platinum compounds." *Nature* **235**(5336): 282-4.

Roberts, R. J. (2004). "Identifying protein function--a call for community action." *PLoS Biol* **2**(3): E42.

Rodriguez-Antona, C. and M. Ingelman-Sundberg (2006). "Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer." *Oncogene* **25**(11): 1679-91.

Roitberg, A. E., M. J. Holden, M. P. Mayhew, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan and V. L. Vilker (1998). "Binding and Electron Transfer between Putidaredoxin and Cytochrome P450cam. Theory and Experiments." *J Am Chem Soc* **120**(35).

Rosic, N. N., W. Huang, W. A. Johnston, J. J. DeVoss and E. M. Gillam (2007). "Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling." *Gene* **395**(1-2): 40-8.

Ross, W. E. and M. O. Bradley (1981). "DNA double-stranded breaks in mammalian cells after exposure to intercalating agents." *Biochim Biophys Acta* **654**(1): 129-34.

Rothenberg, M. L., J. G. Kuhn, H. A. Burris, 3rd, J. Nelson, J. R. Eckardt, M. Tristan-Morales, S. G. Hilsenbeck, G. R. Weiss, L. S. Smith, G. I. Rodriguez and et al. (1993). "Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11." *J Clin Oncol* **11**(11): 2194-204.

Roussel, F., K. K. Khan and J. R. Halpert (2000). "The importance of SRS-1 residues in catalytic specificity of human cytochrome P450 3A4." *Arch Biochem Biophys* **374**(2): 269-78.

Roy, P. and D. J. Waxman (2006). "Activation of oxazaphosphorines by cytochrome P450: application to gene-directed enzyme prodrug therapy for cancer." *Toxicol In Vitro* **20**(2): 176-86.

Roy, P., L. J. Yu, C. L. Crespi and D. J. Waxman (1999). "Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles." *Drug Metab Dispos* **27**(6): 655-66.

Rozman, D., M. Stromstedt, L. C. Tsui, S. W. Scherer and M. R. Waterman (1996). "Structure and mapping of the human lanosterol 14alpha-demethylase gene (CYP51) encoding the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis; comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes." *Genomics* **38**(3): 371-81.

Rupasinghe, S. G., H. Duan, H. L. Frericks Schmidt, D. A. Berthold, C. M. Rienstra and M. A. Schuler (2007). "High-yield expression and purification of isotopically labeled cytochrome P450 monooxygenases for solid-state NMR spectroscopy." *Biochim Biophys Acta* **1768**(12): 3061-70.

Russ, W. P., D. M. Lowery, P. Mishra, M. B. Yaffe and R. Ranganathan (2005). "Natural-like function in artificial WW domains." *Nature* **437**(7058): 579-83.

Ryan, K. J. and L. L. Engel (1957). "Hydroxylation of steroids at carbon 21." *J Biol Chem* **225**(1): 103-14.

Sachse, C., J. Brockmoller, S. Bauer and I. Roots (1997). "Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences." *Am J Hum Genet* **60**(2): 284-95.

Sakaguchi, M., K. Mihara and R. Sato (1987). "A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence." *Embo J* **6**(8): 2425-31.

Sakurai, H. and T. Yoshimura (1985). "Models for coordination site of cytochrome P-450, characterization of hemin-thiolato complexes with S, O, and N donor ligands by electronic absorption and electron spin resonance spectra." *J Inorg Biochem* **24**(2): 75-96.

Salmons, B., M. Lohr and W. H. Gunzburg (2003). "Treatment of inoperable pancreatic carcinoma using a cell-based local chemotherapy: results of a phase I/II clinical trial." *J Gastroenterol* **38 Suppl 15**: 78-84.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning*. 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press.

Sancar, A. (2003). "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." *Chem Rev* **103**(6): 2203-37.

Sanvicens, N. and M. P. Marco (2008). "Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine." *Trends Biotechnol* **26**(8): 425-33.

Sapra, P., E. H. Moase, J. Ma and T. M. Allen (2004). "Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab' fragments." *Clin Cancer Res* **10**(3): 1100-11.

Saukkonen, K. and A. Hemminki (2004). "Tissue-specific promoters for cancer gene therapy." *Expert Opin Biol Ther* **4**(5): 683-96.

Schellhammer, P., R. Sharifi, N. Block, M. Soloway, P. Venner, A. L. Patterson, M. Sarosdy, N. Vogelzang, J. Jones and G. Kolvenbag (1995). "A controlled trial of bicalutamide versus flutamide, each in combination with luteinizing hormone-releasing hormone analogue therapy, in patients with advanced prostate cancer. Casodex Combination Study Group." *Urology* **45**(5): 745-52.

Schleinkofer, K., Sudarko, P. J. Winn, S. K. Ludemann and R. C. Wade (2005). "Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling?" *EMBO Rep* **6**(6): 584-9.

Schlichting, I., J. Berendzen, K. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, R. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko and S. G. Sligar (2000). "The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution." *Science* **287**(5458): 1615-22.

Schmidt, M. and H. Bastians (2007). "Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs." *Drug Resist Updat* **10**(4-5): 162-81.

Schmidt, R., F. Baumann, H. Hanschmann, F. Geissler and R. Preiss (2001). "Gender difference in ifosfamide metabolism by human liver microsomes." *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **26**(3): 193-200.

Schuler, M. A. and D. Werck-Reichhart (2003). "Functional genomics of P450s." *Annu Rev Plant Biol* **54**: 629-67.

Schwartz, P. S., C. S. Chen and D. J. Waxman (2002). "Enhanced bystander cytotoxicity of P450 gene-directed enzyme prodrug therapy by expression of the antiapoptotic factor p35." *Cancer Res* **62**(23): 6928-37.

Schwartz, P. S., C. S. Chen and D. J. Waxman (2003). "Sustained P450 expression and prodrug activation in bolus cyclophosphamide-treated cultured tumor cells. Impact of prodrug schedule on P450 gene-directed enzyme prodrug therapy." *Cancer Gene Ther* **10**(8): 571-82.

Schwartz, P. S. and D. J. Waxman (2001). "Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells." *Mol Pharmacol* **60**(6): 1268-79.

Schwarz, D., W. Richter, V. Kruger, A. Chernogolov, S. Usanov and A. Stier (1994). "Direct visualization of a cardiolipin-dependent cytochrome P450scc-induced vesicle aggregation." *J Struct Biol* **113**(3): 207-15.

Scott, E. E., Y. A. He, M. R. Wester, M. A. White, C. C. Chin, J. R. Halpert, E. F. Johnson and C. D. Stout (2003). "An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-A resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13196-201.

Scott, E. E., H. Liu, Y. Qun He, W. Li and J. R. Halpert (2004). "Mutagenesis and molecular dynamics suggest structural and functional roles for residues in the N-terminal portion of the cytochrome P450 2B1 I helix." *Arch Biochem Biophys* **423**(2): 266-76.

Scott, E. E., M. A. White, Y. A. He, E. F. Johnson, C. D. Stout and J. R. Halpert (2004). "Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-A resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding." *J Biol Chem* **279**(26): 27294-301.

Sedgwick, B., P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs and T. Lindahl (2007). "Repair of alkylated DNA: recent advances." *DNA Repair (Amst)* **6**(4): 429-42.

Setlow, R. B. and W. L. Carrier (1966). "Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's." *J Mol Biol* **17**(1): 237-54.

Sheff, M. A. and K. S. Thorn (2004). "Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in Saccharomyces cerevisiae." *Yeast* **21**(8): 661-70.

Shen, Y. (2008). "Advances in the development of siRNA-based therapeutics for cancer." *IDrugs* **11**(8): 572-8.

Sieber, V., C. A. Martinez and F. H. Arnold (2001). "Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences." *Nat Biotechnol* **19**(5): 456-60.

Silberg, J. J., J. B. Endelman and F. H. Arnold (2004). "SCHEMA-guided protein recombination." *Methods Enzymol* **388**: 35-42.

Singer, B. (1985). "In vivo formation and persistence of modified nucleosides resulting from alkylating agents." *Environ Health Perspect* **62**: 41-8.

Singh, V., D. Parmar and M. P. Singh (2008). "Do single nucleotide polymorphisms in xenobiotic metabolizing genes determine breast cancer susceptibility and treatment outcomes?" *Cancer Invest* **26**(8): 769-83.

Skare, J. A. and K. R. Schrotel (1984). "Alkaline elution of rat testicular DNA: detection of DNA cross-links after in vivo treatment with chemical mutagens." *Mutat Res* **130**(4): 295-303.

Sladek, N. E. (1988). "Metabolism of oxazaphosphorines." *Pharmacol Ther* **37**(3): 301-55.

Sladek, N. E. (1999). "Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines." *Curr Pharm Des* **5**(8): 607-25.

Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga and L. Norton (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." *N Engl J Med* **344**(11): 783-92.

Sligar, S. G., T. M. Makris and I. G. Denisov (2005). "Thirty years of microbial P450 monooxygenase research: peroxo-heme intermediates--the central bus station in heme oxygenase catalysis." *Biochem Biophys Res Commun* **338**(1): 346-54.

Smith, G. E., M. D. Summers and M. J. Fraser (1983). "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector." *Mol Cell Biol* **3**(12): 2156-65.

Smythe, W. R. (2002). "Current therapy for malignant mesothelioma." *Curr Oncol Rep* **4**(4): 305-13.

Smythe, W. R., H. C. Hwang, A. A. Elshami, K. M. Amin, S. L. Eck, B. L. Davidson, J. M. Wilson, L. R. Kaiser and S. M. Albelda (1995). "Treatment of experimental human mesothelioma using adenovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene." *Ann Surg* **222**(1): 78-86.

Socolich, M., S. W. Lockless, W. P. Russ, H. Lee, K. H. Gardner and R. Ranganathan (2005). "Evolutionary information for specifying a protein fold." *Nature* **437**(7058): 512-8.

Soffietti, R., B. Leoncini and R. Ruda (2007). "New developments in the treatment of malignant gliomas." *Expert Rev Neurother* **7**(10): 1313-26.

Spatzenegger, M., H. Liu, Q. Wang, A. Debarber, D. R. Koop and J. R. Halpert (2003). "Analysis of differential substrate selectivities of CYP2B6 and CYP2E1 by site-directed mutagenesis and molecular modeling." *J Pharmacol Exp Ther* **304**(1): 477-87.

Springer, C. J. and I. Niculescu-Duvaz (2000). "Prodrug-activating systems in suicide gene therapy." *J Clin Invest* **105**(9): 1161-7.

Sreerama, L. and N. E. Sladek (1994). "Identification of a methylcholanthrene-induced aldehyde dehydrogenase in a human breast adenocarcinoma cell line exhibiting oxazaphosphorine-specific acquired resistance." *Cancer Res* **54**(8): 2176-85.

Srikanth, C. V., A. K. Chakraborti and A. K. Bachhawat (2005). "Acetaminophen toxicity and resistance in the yeast Saccharomyces cerevisiae." *Microbiology* **151**(Pt 1): 99-111.

Stemmer, W. P. (1994). "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10747-51.

Stevens, J. C., R. B. White, S. H. Hsu and M. Martinet (1997). "Human liver CYP2B6-catalyzed hydroxylation of RP 73401." *J Pharmacol Exp Ther* **282**(3): 1389-95.

Stikkelbroeck, N. M., L. H. Hoefsloot, I. J. de Wijs, B. J. Otten, A. R. Hermus and E. A. Sistermans (2003). "CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(8): 3852-9.

Stresser, D. M. and D. Kupfer (1999). "Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-450 2B6." *Drug Metab Dispos* **27**(4): 517-25.

Stribbling, S. M., J. Martin, R. B. Pedley, J. A. Boden, S. K. Sharma and C. J. Springer (1997). "Biodistribution of an antibody-enzyme conjugate for antibody-directed enzyme prodrug therapy in nude mice bearing a human colon adenocarcinoma xenograft." *Cancer Chemother Pharmacol* **40**(4): 277-84.

Strobel, H. W., A. Y. Lu, J. Heidema and M. J. Coon (1970). "Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation." *J Biol Chem* **245**(18): 4851-4.

Stubbins, M. J., L. W. Harries, G. Smith, M. H. Tarbit and C. R. Wolf (1996). "Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus." *Pharmacogenetics* **6**(5): 429-39.

Suzuki, M., R. N. Singh and R. G. Crystal (1996). "Regulatable promoters for use in gene therapy applications: modification of the 5'-flanking region of the CFTR gene with multiple cAMP response elements to support basal, low-level gene expression that can be upregulated by exogenous agents that raise intracellular levels of cAMP." *Hum Gene Ther* **7**(15): 1883-93.

Swisher, S. G., J. A. Roth, J. Nemunaitis, D. D. Lawrence, B. L. Kemp, C. H. Carrasco, D. G. Connors, A. K. El-Naggar, F. Fossella, B. S. Glisson, W. K. Hong, F. R. Khuri, J. M. Kurie, J. J. Lee, J. S. Lee, M. Mack, J. A. Merritt, D. M. Nguyen, J. C. Nesbitt, R. Perez-Soler, K. M. Pisters, J. B. Putnam, Jr., W. R. Richli, M. Savin, D. S. Schrump, D. M. Shin, A. Shulkin, G. L. Walsh, J. Wait, D. Weill and M. K. Waugh (1999). "Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* **91**(9): 763-71.

Syrigos, K. N. and A. A. Epenetos (1999). "Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations." *Anticancer Res* **19**(1A): 605-13.

Szklarz, G. D., Y. Q. He, K. M. Kedzie, J. R. Halpert and V. L. Burnett (1996). "Elucidation of amino acid residues critical for unique activities of rabbit cytochrome P450 2B5 using hybrid enzymes and reciprocal site-directed mutagenesis with rabbit cytochrome P450 2B4." *Arch Biochem Biophys* **327**(2): 308-18.

Taly, V., P. Urban, G. Truan and D. Pompon (2007). "A combinatorial approach to substrate discrimination in the P450 CYP1A subfamily." *Biochim Biophys Acta* **1770**(3): 446-57.

Tao, J., Y. T. Tu, C. Z. Huang, A. P. Feng, Q. Wu, Y. J. Lian, L. X. Zhang, X. P. Zhang and G. X. Shen (2005). "Inhibiting the growth of malignant melanoma by blocking the expression of vascular endothelial growth factor using an RNA interference approach." *Br J Dermatol* **153**(4): 715-24.

Tatko, C. D. and M. L. Waters (2004). "Investigation of the nature of the methionine-pi interaction in beta-hairpin peptide model systems." *Protein Sci* **13**(9): 2515-22.

Thybaud, V., M. Aardema, J. Clements, K. Dearfield, S. Galloway, M. Hayashi, D. Jacobson-Kram, D. Kirkland, J. T. MacGregor, D. Marzin, W. Ohyama, M. Schuler, H. Suzuki and E. Zeiger (2007). "Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing." *Mutat Res* **627**(1): 41-58.

Tippin, B., P. Pham and M. F. Goodman (2004). "Error-prone replication for better or worse." *Trends Microbiol* **12**(6): 288-95.

Tong, J. C., T. W. Tan and S. Ranganathan (2007). "Methods and protocols for prediction of immunogenic epitopes." *Brief Bioinform* **8**(2): 96-108.

Toussaint, M. and A. Conconi (2006). "High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents." *Nat Protoc* **1**(4): 1922-8.

Toussaint, M., G. Levasseur, J. Gervais-Bird, R. J. Wellinger, S. A. Elela and A. Conconi (2006). "A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures." *Mutat Res* **606**(1-2): 92-105.

Truan, G., C. Cullin, P. Reisdorf, P. Urban and D. Pompon (1993). "Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5." *Gene* **125**(1): 49-55.

Tychopoulos, M. (2005). Sensibilisation de cellules tumorales au cyclophosphamide par transfert du gène CYP2B6. Amélioration de cette stratégie en modifiant l'efficacité catalytique du CYP2B6 par mutagenèse dirigée. *Thèse de doctorat*. Paris: Université Paris 5, 157 p.

Tychopoulos, M., L. Corcos, P. Genne, P. Beaune and I. de Waziers (2005). "A virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) strategy for lung cancer using a CYP2B6/NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein." *Cancer Gene Therapy* **12**(5): 497-508.

Uno, T. and Y. Imai (1992). "Further studies on chimeric P450 2C2/2C14 having testosterone 16 beta-hydroxylase activity which is absent in the parental P450s." *J Biochem* **112**(1): 155-62.

Uno, T., S. Okamoto, S. Masuda, A. Itoh, Y. Uno, M. Nakamura, K. Kanamaru, H. Yamagata and H. Imaishi (2008). "Bioconversion of small molecules by cytochrome P450 species expressed in Escherichia coli." *Biotechnol Appl Biochem* **50**(Pt 4): 165-71.

Urban, P., C. Cullin and D. Pompon (1990). "Maximizing the expression of mammalian cytochrome P-450 monooxygenase activities in yeast cells." *Biochimie* **72**(6-7): 463-72.

Urban, P., C. Mignotte, M. Kazmaier, F. Delorme and D. Pompon (1997). "Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related Arabidopsis thaliana NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5." *J Biol Chem* **272**(31): 19176-86.

Urban, P., G. Truan, A. Bellamine, R. Laine, J. C. Gautier and D. Pompon (1994). "Engineered yeasts simulating P450-dependent metabolisms: tricks, myths and reality." *Drug Metabol Drug Interact* **11**(3): 169-200.

Urban, P., G. Truan, J. C. Gautier and D. Pompon (1993). "Xenobiotic metabolism in humanized yeast: engineered yeast cells producing human NADPH-cytochrome P-450 reductase, cytochrome b5, epoxide hydrolase and P-450s." *Biochem Soc Trans* **21**(4): 1028-34.

Urban, P., G. Truan and D. Pompon (2008). "High-throughput enzymology and combinatorial mutagenesis for mining cytochrome P450 functions." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**(6): 733-47.

van der Hoeven, T. A. and M. J. Coon (1974). "Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes." *J Biol Chem* **249**(19): 6302-10.

Van Gompel, J., F. Woestenborghs, D. Beerens, C. Mackie, P. A. Cahill, A. W. Knight, N. Billinton, D. J. Tweats and R. M. Walmsley (2005). "An assessment of the utility of the yeast GreenScreen assay in pharmaceutical screening." *Mutagenesis* **20**(6): 449-54.

Vasiliou, V., A. Pappa and D. R. Petersen (2000). "Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism." *Chem Biol Interact* **129**(1-2): 1-19.

Voelcker, G. and R. Haeglsperger (1982). "[Pharmacokinetics of cyclophosphamide and cyclophosphamide metabolites in the mouse and their influence on the therapeutic effect of "activated" cyclophosphamide (4-hydroxycyclophosphamide) (author's transl)]." *Arzneimittelforschung* **32**(6): 639-47.

Voigt, C. A., C. Martinez, Z. G. Wang, S. L. Mayo and F. H. Arnold (2002). "Protein building blocks preserved by recombination." *Nat Struct Biol* **9**(7): 553-8.

von Wachenfeldt, C. and E. F. Johnson (1995). Structures of eukaryotic Cytochrome P450 enzymes. In: P.R. Ortiz de Montellano. *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism and Biochemistry*. 2nd edition. New York: Plenum Press, p. 183-223.

von Wachenfeldt, C., T. H. Richardson, J. Cosme and E. F. Johnson (1997). "Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in Escherichia coli following modification of its N-terminus." *Arch Biochem Biophys* **339**(1): 107-14.

Vore, M. (1994). "Phase III elimination: another two-edge sword." *Environ Health Perspect* **102**(5): 422-3.

Wade, R. C., P. J. Winn, I. Schlichting and Sudarko (2004). "A survey of active site access channels in cytochromes P450." *J Inorg Biochem* **98**(7): 1175-82.

Waggoner, L. E., G. T. Zhou, R. W. Schafer and W. R. Schafer (1998). "Control of alternative behavioral states by serotonin in Caenorhabditis elegans." *Neuron* **21**(1): 203-14.

Walmsley, R., P. O. Keenan, A. W. Knight and J. Schmuckli (2000). Validation of the Gentronix RAD54-GFP assay with environmental samples. *BIOSET Technical Workshop on Genotoxicity Biosensing - TECHNOTOX*, Mol, Belgium.

Walmsley, R. M., N. Billinton and W. D. Heyer (1997). "Green fluorescent protein as a reporter for the DNA damage-induced gene RAD54 in Saccharomyces cerevisiae." *Yeast* **13**(16): 1535-45.

Walsh, M. E., P. Kyritsis, N. A. Eady, H. A. Hill and L. L. Wong (2000). "Catalytic reductive dehalogenation of hexachloroethane by molecular variants of cytochrome P450cam (CYP101)." *Eur J Biochem* **267**(18): 5815-20.

Wang, D. Y., R. Fulthorpe, S. N. Liss and E. A. Edwards (2004). "Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1." *Mol Endocrinol* **18**(2): 402-11.

Wang, J., A. Sonnerborg, A. Rane, F. Josephson, S. Lundgren, L. Stahle and M. Ingelman-Sundberg (2006). "Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz." *Pharmacogenet Genomics* **16**(3): 191-8.

Wang, L. H., A. L. Tsai and P. Y. Hsu (2001). "Substrate binding is the rate-limiting step in thromboxane synthase catalysis." *J Biol Chem* **276**(18): 14737-43.

Wang, Q. and J. R. Halpert (2002). "Combined three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of cytochrome P450 2B6 substrates and protein homology modeling." *Drug Metab Dispos* **30**(1): 86-95.

Wang, S., H. Liu, L. Ren, Y. Pan and Y. Zhang (2008). "Inhibiting colorectal carcinoma growth and metastasis by blocking the expression of VEGF using RNA interference." *Neoplasia* **10**(4): 399-407.

Waterman, M. R. (1994). "Heterologous expression of mammalian P450 enzymes." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **68**: 37-66.

Waxman, D. J. (1999). "P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR." *Arch Biochem Biophys* **369**(1): 11-23.

Waxman, D. J., L. Chen, J. E. Hecht and Y. Jounaidi (1999). "Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects." *Drug Metab Rev* **31**(2): 503-22.

Waxman, D. J. and P. S. Schwartz (2003). "Harnessing apoptosis for improved anticancer gene therapy." *Cancer Res* **63**(24): 8563-72.

Wei, J. Y., T. C. Pochapsky and S. S. Pochapsky (2005). "Detection of a high-barrier conformational change in the active site of cytochrome P450cam upon binding of putidaredoxin." *J Am Chem Soc* **127**(19): 6974-6.

Wei, M. X., T. Tamiya, M. Chase, E. J. Boviatsis, T. K. Chang, N. W. Kowall, F. H. Hochberg, D. J. Waxman, X. O. Breakefield and E. A. Chiocca (1994). "Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene." *Hum Gene Ther* **5**(8): 969-78.

Weis, W. I. and K. Drickamer (1996). "Structural basis of lectin-carbohydrate recognition." *Annu Rev Biochem* **65**: 441-73.

Weiss, R. B. (1992). "The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?" *Semin Oncol* **19**(6): 670-86.

Werck-Reichhart, D. and R. Feyereisen (2000). "Cytochromes P450: a success story." *Genome Biol* **1**(6): REVIEWS3003.

Wester, M. R., E. F. Johnson, C. Marques-Soares, P. M. Dansette, D. Mansuy and C. D. Stout (2003). "Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 A resolution: evidence for multiple substrate binding modes." *Biochemistry* **42**(21): 6370-9.

Wester, M. R., E. F. Johnson, C. Marques-Soares, S. Dijols, P. M. Dansette, D. Mansuy and C. D. Stout (2003). "Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 A resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding." *Biochemistry* **42**(31): 9335-45.

White, P. C. and P. W. Speiser (2000). "Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency." *Endocr Rev* **21**(3): 245-91.

White, R. E. and M. J. Coon (1980). "Oxygen activation by cytochrome P-450." *Annu Rev Biochem* **49**: 315-56.

Wilk, S., H. Mizoguchi and M. Orlowski (1978). "gamma-Glutamyl dopa: a kidney-specific dopamine precursor." *J Pharmacol Exp Ther* **206**(1): 227-32.

Williams, P. A., J. Cosme, V. Sridhar, E. F. Johnson and D. E. McRee (2000). "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity." *Mol Cell* **5**(1): 121-31.

Williams, P. A., J. Cosme, V. Sridhar, E. F. Johnson and D. E. McRee (2000). "Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features." *J Inorg Biochem* **81**(3): 183-90.

Williams, P. A., J. Cosme, D. M. Vinkovic, A. Ward, H. C. Angove, P. J. Day, C. Vonrhein, I. J. Tickle and H. Jhoti (2004). "Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone." *Science* **305**(5684): 683-6.

Winn, P. J., S. K. Ludemann, R. Gauges, V. Lounnas and R. C. Wade (2002). "Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5361-6.

Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P. L. Felgner (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." *Science* **247**(4949 Pt 1): 1465-8.

Wolner, B., S. van Komen, P. Sung and C. L. Peterson (2003). "Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast." *Mol Cell* **12**(1): 221-32.

Wong, T. S., D. Roccatano, M. Zacharias and U. Schwaneberg (2006). "A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution." *J Mol Biol* **355**(4): 858-71.

Wong, T. S., K. L. Tee, B. Hauer and U. Schwaneberg (2004). "Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution." *Nucleic Acids Res* **32**(3): e26.

Wood, R. D., M. Mitchell, J. Sgouros and T. Lindahl (2001). "Human DNA repair genes." *Science* **291**(5507): 1284-9.

Woodland, C., S. Ito, C. P. Granvil, I. W. Wainer, J. Klein and G. Koren (2000). "Evidence of renal metabolism of ifosfamide to nephrotoxic metabolites." *Life Sci* **68**(1): 109-17.

Wu, X., H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale and M. P. Bruchez (2003). "Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots." *Nat Biotechnol* **21**(1): 41-6.

Xie, H. J., U. Yasar, S. Lundgren, L. Griskevicius, Y. Terelius, M. Hassan and A. Rane (2003). "Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation." *Pharmacogenomics J* **3**(1): 53-61.

Xing, Y., Q. Chaudry, C. Shen, K. Y. Kong, H. E. Zhau, L. W. Chung, J. A. Petros, R. M. O'Regan, M. V. Yezhelyev, J. W. Simons, M. D. Wang and S. Nie (2007). "Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry." *Nat Protoc* **2**(5): 1152-65.

Yamano, S., P. T. Nhamburo, T. Aoyama, U. A. Meyer, T. Inaba, W. Kalow, H. V. Gelboin, O. W. McBride and F. J. Gonzalez (1989). "cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential expression of the IIB mRNAs in human liver." *Biochemistry* **28**(18): 7340-8.

Yang, T. J., K. W. Krausz, M. Shou, S. K. Yang, J. T. Buters, F. J. Gonzalez and H. V. Gelboin (1998). "Inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2B6." *Biochem Pharmacol* **55**(10): 1633-40.

Yu, L. J., J. Matias, D. A. Scudiero, K. M. Hite, A. Monks, E. A. Sausville and D. J. Waxman (2001). "P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel." *Drug Metab Dispos* **29**(3): 304-12.

Yuan, L., I. Kurek, J. English and R. Keenan (2005). "Laboratory-directed protein evolution." *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(3): 373-92.

Yuan, Z. M., P. B. Smith, R. B. Brundrett, M. Colvin and C. Fenselau (1991). "Glutathione conjugation with phosphoramide mustard and cyclophosphamide. A mechanistic study using tandem mass spectrometry." *Drug Metab Dispos* **19**(3): 625-9.

Yule, S. M., L. Price, A. D. Pearson and A. V. Boddy (1997). "Cyclophosphamide and ifosfamide metabolites in the cerebrospinal fluid of children." *Clin Cancer Res* **3**(11): 1985-92.

Yun, C. H., G. P. Miller and F. P. Guengerich (2000). "Rate-determining steps in phenacetin oxidations by human cytochrome P450 1A2 and selected mutants." *Biochemistry* **39**(37): 11319-29.

Zanger, U. M., H. P. Hauri, J. Loeper, J. C. Homberg and U. A. Meyer (1988). "Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 8256-60.

Zhang, H., P. D'Arpa and L. F. Liu (1990). "A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons." *Cancer Cells* **2**(1): 23-7.

Zhang, H., S. C. Im and L. Waskell (2007). "Cytochrome b5 increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4." *J Biol Chem* **282**(41): 29766-76.

Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter and F. H. Arnold (1998). "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination." *Nat Biotechnol* **16**(3): 258-61.

Zhao, Y. and J. R. Halpert (2007). "Structure-function analysis of cytochromes P450 2B." *Biochim Biophys Acta* **1770**(3): 402-12.

Zhao, Y., M. A. White, B. K. Muralidhara, L. Sun, J. R. Halpert and C. D. Stout (2006). "Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole: insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction." *J Biol Chem* **281**(9): 5973-81.

Zhou, F. X., H. J. Merianos, A. T. Brunger and D. M. Engelman (2001). "Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2250-5.

Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts and K. van 't Riet (1990). "Modeling of the Bacterial Growth Curve." *Appl Environ Microbiol* **56**(6): 1875-1881.

Résumé

Le souhait de réduire des effets secondaires associés aux anticancéreux a mené à considérer l'utilisation de prodrogues activables au site d'action, comme la cyclophosphamide (CPA). La CPA est activée majoritairement par le CYP2B6 humain avec une faible efficacité, obligeant à l'utilisation de concentrations importantes de prodrogue. Celles-ci peuvent être réduites par transfection au niveau de la tumeur d'un gène codant pour un P450 optimisé, possédant une efficacité catalytique élevée vis-à-vis de la CPA tout en étant le moins immunogène possible. Pour ce faire, en partant de la modélisation du CYP2B6 et du CYP2B11, forme canine à bas K_m pour l'activation de la CPA, un gène synthétique du CYP2B11 pour l'expression dans la levure a été dessiné et divisé en 15 "modules" structuraux. Quinze chimères à points de jonction définis entre les deux CYP2Bs ont ensuite été construites par échange de ces modules, *via* une méthode originale de génération de banques ordonnées de chimères, SIGNAL, indépendante de l'homologie de séquence des enzymes parentaux. SIGNAL, à mi-chemin entre les processus classiques d'évolution dirigée et de mutagenèse dirigée, nous a permis, après analyse fonctionnelle des chimères, de mieux comprendre le mécanisme de métabolisation de la CPA par les deux enzymes et d'identifier des modules structuraux jouant potentiellement un rôle important dans la haute affinité du CYP2B11. En parallèle, la mise au point d'un système de sélection à haut débit des variants les plus efficaces pour l'activation de la CPA dans la levure, basé sur le principe du gène rapporteur, a été débutée, afin de pouvoir raffiner l'optimisation du P450 par un processus de mutagenèse aléatoire.

Mots clef : Cytochrome P450, Banques combinatoires ordonnées, Cyclophosphamide, relations structure-fonction

Abstract

One of the possibilities considered to reduce the side effects associated to chemotherapeutic treatments was to use cytotoxic prodrugs, like cyclophosphamide (CPA), activated directly into the tumors. CPA is mainly activated with a low efficiency by human CYP2B6, so large doses of prodrug are used to induce a response. The transfection of an optimized CYP gene, possessing a high catalytic efficiency towards CPA while presenting a low immunogenicity, is a route to lower active doses. For this purpose, the canine CYP2B11, which exhibits a low K_m for CPA activation, was modelled and divided into 15 structural "modules". A synthetic CYP2B11 gene was designed to permit a good expression in yeast and to swap defined modules between the human and canine forms. An original sequence – independent method, SIGNAL, was developed, which allowed the construction of 15 chimeras with defined junction points. This ordered library, halfway between random directed evolution and defined directed mutagenesis, permitted the generation of targeted diversity, which do not need a high-throughput approach for functional analysis. Resulting information highlighted critical segments for CPA metabolism, which are potentially involved in the high CYP2B11 affinity. The P450 functional optimization could be further enhanced by a random mutagenesis process, which requires, in contrast, a high throughput screening system. Its development in *S.cerevisiae* was initiated using a reporter gene method.

Keywords : Cytochrome P450, Ordered combinatorial libraries, Cyclophosphamide, Structure–function relationships

LABORATOIRE D'INGENIERIE DES PROTEINES MEMBRANAIRES
CENTRE DE GENETIQUE MOLECULAIRE
1, avenue de la Terrasse
91198 GIF SUR YVETTE CEDEX

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR "FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY"
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex