



HAL
open science

Contribution à la connaissance du chemin réactionnel des glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénases phosphorylantes: Structures cristallines de complexes ternaires (enzyme mutée + cofacteur + substrat)

Mustapha Fatih

► **To cite this version:**

Mustapha Fatih. Contribution à la connaissance du chemin réactionnel des glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénases phosphorylantes: Structures cristallines de complexes ternaires (enzyme mutée + cofacteur + substrat). Chimie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2000. Français. NNT : 2000NAN10074 . tel-01747538

HAL Id: tel-01747538

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747538v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

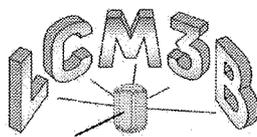
LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



U.F.R.: STMP

Ecole Doctorale : PROMEMA

G.F.D.: Physique et Chimie de la
Matière et des Matériaux

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Spécialité Biocristallographie

Par

Mustapha FATIH

**Contribution à la connaissance du chemin réactionnel des
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases
phosphorylantes:**

**Structures cristallines de complexes ternaires (enzyme mutée +
cofacteur + substrat)**

Soutenance publique prévue le 5 Juin 2000 devant la commission d'examen

M. G. Précigoux	Directeur de Recherches au C.N.R.S, Talence , <i>Rapporteur</i>
M. D. Rognan	Assistant Professeur à ETH, Zürich, <i>Rapporteur</i>
M. A. Aubry	Directeur de Recherches au C.N.R.S, Nancy I
M. G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
M. C. Didierjean	Maître de Conférence , Université Henri Poincaré, Nancy I

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire de cristallographie et modélisation des matériaux minéraux et biologiques. Je remercie Monsieur le Professeur Claude Lecomte et Monsieur le Directeur de Recherches André Aubry de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et de m'avoir apporté les moyens matériels pour réaliser ce travail.

Je remercie particulièrement Monsieur André Aubry pour sa disponibilité et la qualité de la formation scientifique qu'il m'a apportée en cristallographie des protéines.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Didier Rognan pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour l'ensemble des connaissances scientifiques qu'il m'a apportées.

Je remercie Monsieur le Directeur de Recherches Gilles Précigoux d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je suis également très reconnaissant à Monsieur le Professeur Guy Branlant, pour les discussions scientifiques que nous avons eues et qui m'ont été précieuses.

J'adresse mes profonds remerciements à Catherine Corbier et Claude Didierjean pour tout le temps qu'ils m'ont consacré et l'aide efficace qu'ils m'ont apportée lors de la rédaction de ce manuscrit et pour toutes les discussions passionnantes que nous avons eues tout au long de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Niels Hansen pour sa disponibilité et pour la sympathie qu'il m'a montrée au cours de cette période, ainsi que pour son aide pour les problèmes de programmation.

J'adresse mes profonds remerciements à Nour-eddine Ghermani et Saïd Azza pour leurs encouragements dans les moments difficiles et pour leurs conseils.

Je remercie Majid Taleb et Jean-Paul Declé pour leurs aides et les discussions que nous avons eues tout au long de ce travail.

Un grand merci à tout le personnel du laboratoire de cristallographie et modélisation des matériaux minéraux et biologiques avec qui j'ai découvert, dans la bonne humeur, de nombreuses techniques de biologie et de cristallographie.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes parents qui m'ont soutenu et supporté avec beaucoup de patience pendant ces années de thèse, et sans qui ce travail n'aurait pas pu être accompli.

Table des Matières

<i>Introduction générale</i>	2
<i>Chapitre I : Sites anioniques dans les Protéines</i>	4
1. <i>Introduction</i>	4
2. <i>Les caractéristiques générales des sites de reconnaissance anionique</i>	9
3. <i>Les caractéristiques des sites de fixation du phosphate</i>	12
3. 1. Les différents types de sites de fixation des groupements phosphates	13
3. 2. Les interactions des phosphates avec les sites de fixation.....	14
3. 3. Acides aminés rencontrés préférentiellement dans les sites de fixation de phosphate	14
3. 4. Le voisinage séquentiel des ligands.....	14
3. 5. La conservation des sites de fixation des groupements phosphate	15
<i>Chapitre II : La Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase phosphorylante</i>	16
II. 1. <i>Les différentes classes de GAPDH</i>	16
II. 2. <i>Rôle enzymatique de la GAPDH glycolytique</i>	17
II. 3. <i>Structure de la GAPDH glycolytique</i>	18
II. 3. 1. Structure primaire.....	18
II. 3. 2. Structure tridimensionnelle	18
II. 3. 2. a- Structure globale	18
II. 3. 2. b- Structure du monomère.....	20
Domaine de fixation du cofacteur NAD ⁺	20
Domaine catalytique	27
II. 4. <i>Mécanisme catalytique de la GAPDH</i>	28
II. 4. 1. Introduction	28
II. 4. 2. Mécanisme détaillé.....	30
II. 4. 2. a. Formation de l'intermédiaire thiohémiacétal	30
II. 4. 2. b. Formation de l'acylenzyme	32
II. 4. 2. c. Intermédiaire phosphorylé.....	33
II. 4. 2. d. Relargage du produit	34
<i>Chapitre III : Sites anioniques et complexes ternaires de la GAPDH</i>	36
III. 1. <i>Description du site actif de la GAPDH</i>	36
III. 1. 1. Les résidus catalytiques : Cys149 et His176	36

III. 1. 2. Les sites anioniques	38
a) Site Ps	38
b) Site Pi.....	39
III. 2. Etude bibliographique des complexes ternaires de la GAPDH.....	41
III. 2. 1. Structures de complexes ternaires étudiés (GAPDH + NAD ⁺ + inhibiteur)	41
III. 2. 2. Modèles structuraux de mécanisme catalytique : contribution respective des sites Pi et Ps.....	47
III. 3. Objectifs.....	50
Chapitre IV : Techniques et principes	53
IV. 1. Introduction	53
IV. 2. Méthodes d'enregistrement des données à basse température	55
IV.2.1. Cryocristallographie	55
1. Introduction.....	55
2. La dégradation par la radiation	56
3. Principe de la cryoprotection	57
4. Rôle des agents cryoprotecteurs	57
5. Méthodes.....	58
5.1. Cryostats	59
5.2. Choix du cristal.....	59
5.3. Cryoprotecteurs.....	60
5.4. Instrumentation pour le montage des cristaux	62
5.5. Montage et transfert des cristaux	64
5.6. Refroidissement rapide 'Flash cooling'	64
5.7. Stockage et transport des cristaux.....	65
6. Applications	66
Chapitre V : Résultats.....	68
1. Production, purification et caractérisation des GAPDH de B. stearothermophilus	68
1.1. Production et purification	68
1.2. Activité GAPDH de l'enzyme de type sauvage et des mutants C149A et C149S	69
2. Cristallisation.....	70
2.1. Préparation de l'enzyme	70
2.2. Cristallisation.....	71

2.2.1. Mode opératoire.....	71
2.2.2. Résultats.....	71
3. Enregistrement des données.....	74
3. 1. Introduction.....	74
3. 2. Analyse cristallographique préliminaire.....	75
4. Conditions de cryoprotection et transfert des cristaux.....	76
4. . Introduction.....	76
4. 2. Complexe binaire I (forme BI)	76
4. 3. Complexe binaire II (forme BII).....	77
4. 4 Préparation du substrat pour les complexes ternaires.....	77
4. 5. Complexe ternaire I (mutant C149A+NAD ⁺ +G3P)	78
4. 6. Complexe ternaire II (mutant C149S+NAD ⁺ +G3P).....	79
5. Conditions de mesures.....	79
6. Intégration et réduction des données.....	80
PHASAGE.....	83
1. Application du remplacement moléculaire à la forme hexagonale.....	83
1.1. Fonction de rotation croisée.....	83
1.2. Fonction de translation.....	83
1.3. Affinement en corps rigide	84
2. Application du remplacement moléculaire à la forme monoclinique.....	84
Affinement des modèles.....	87
1.Introduction.....	87
2. Affinement des complexes binaire I et ternaire I.....	87
2.1. Complexe binaire I (C149A + NAD ⁺).....	87
2. 2. Complexe ternaire I (C149A + NAD ⁺ + G3P)	90
3. Affinement des complexes binaire II et ternaire II	92
3. 1. Complexe binaire II (C149S + NAD ⁺)	92
3. 2. Complexe ternaire II	93
4. Qualité de l'affinement	94
4. 1. Densité électronique	94
4. 2. Le diagramme de Ramachandran.....	95
Chapitre VI : Analyse et Discussion	98
1. Introduction.....	98
2. Analyse de l'empilement cristallin.....	98
2.1. Forme hexagonale.....	98

2.2. Forme monoclinique	100
2.3. Etude comparative avec les GAPDH de structures connues	102
Comparaison des empilements cristallins.....	103
3. Analyse structurale des complexes binaires I et II.....	109
3. 1. description succincte des structures des complexes binaires I et II.....	109
3. 1. 1. Introduction.....	109
3. 1. 1. Description du site actif.....	109
3. 1. 1. a. Résidus catalytiques.....	110
3. 1. 1. b. Sites de reconnaissance anionique (Pi et Ps)	110
3.2. Comparaison de la structure des complexes binaires I et II avec l'enzyme de type sauvage.....	111
3. 2. 1. Introduction.....	111
Remarque	111
3. 2. 2. Méthode de comparaison.....	112
3. 2. 3. Domaine catalytique du complexe binaire I	114
3. 2. 4. Domaine catalytique du complexe binaire II.....	116
3.3. Comparaison des sites Pi dans les structures de GAPDH connues.	118
4. Analyse structurale des complexes ternaires I et II.....	121
4. 1. Introduction.....	121
4. 2. Comparaison du domaine catalytique des complexes ternaires I et II.....	121
4. 2. 1. Domaine catalytique du complexe ternaire I	121
4. 2. 2. Domaine catalytique du complexe ternaire II.....	122
4. 3. Description des sites actifs des complexes ternaires I et II.....	124
4. 3. 1. Comparaison des sites actifs des complexes ternaires avec celui de l'holoenzyme de type sauvage.....	127
5.1. Apport de l'analyse structurale des complexes ternaires à la compréhension du mécanisme catalytique.....	128
Discussion sur la position de la partie aldéhyde du substrat :.....	129
Discussion sur la stéréosélectivité de substrat :	131
Discussion sur la position du phosphate du substrat.....	132
Annexe I : Les interactions intra et inter-sous-unités de la GAPDH de B. stearothermophilus.	141
Interactions intra sous-unités de la GAPDH de B. stearothermophilus	141
Interactions inter sous-unités de la GAPDH de B. stearothermophilus.....	142
Annexe II : Présentation des groupes d'espace P3,21 et C2	144

I. Pages de la table internationale du groupe d'espace P3₁21 144
II. Pages de la table internationale du groupe d'espace C2..... 146
Bibliographie..... 148

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54000 VILLERS-LES-NANCY

Liste des abréviations et symboles

$\sigma(I)$	Estimation d'erreur sur l'intensité
1,3dPG	1,3-diphosphoglycérate
D-G3P	D-Glycéraldéhyde-3-phosphate
3PG	3-phosphoglycérate
Å	Unité Angstrom = 10^{-10} m
a, b, c	Axes de la maille cristalline
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
AMP	Adénosine Monophosphate
B	Facteur de température : $B = 8 \pi^2 u^2$, où u est le déplacement moyen des atomes
DO	Densité Optique
DTNB	Dithionitrobenzoate
DTT	Dithiothréitol
E	Enzyme
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FAP	β -(2-furyl)-acryloyl phosphate
F_c	Facteur de structure calculé
F_{calc}	Facteur de structure calculé
F_{hkl}	Facteur de structure
F_o	Facteur de structure observé
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
h, k, l	Indices de Miller
Hepes	4-(2-hydroxyéthyl)-piperazine-1-éthane acide sulfonique
kcat	Constante catalytique
kD	Kilo Dalton
K_M	Constante de Michaelis
MAD	Phasage par diffraction anormale à plusieurs longueurs d'onde
MIR	Remplacement isomorphe multiple
MPD	Méthyl-2, 4-pentanediol
N_A	Nombre d'Avogadro : $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
NaAc	Acétate de sodium
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme oxydée
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme réduite
NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
P, Q, R	Axe orthogonal binaire du tétramère
PDB	Protein Data Bank (banque de données des structures de protéines de Brookhaven)
PEG	Polyéthylène glycol
pHi	pH d'isoélectrofocalisation
Pi	Phosphate inorganique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R_{merge}	Facteur d'accord
TFA	3,3,3-trifluoroacétone
Tris	N-tris(hydroxyméthyl)éthyl-2-aminoéthansulfonate
x, y, z	Coordonnées cartésiennes
□	Angle de Bragg
□	Densité électronique

La D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase glycolytique phosphorylante (*GAPDH* : EC 1.2.1.12) est une enzyme ubiquitaire dans le monde vivant. Elle appartient à la famille des aldéhydes déshydrogénases phosphorylantes à cofacteur NAD(P). Elle catalyse de manière réversible l'oxydation et la phosphorylation du D-glycéraldéhyde-3-phosphate (*D-G3P*) en acide 1,3diphosphoglycérique (*1,3dPG*), en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide NAD^+ comme cofacteur et le phosphate inorganique (HPO_4^{2-}). Cette réaction est réalisée en plusieurs étapes, dont les phases essentielles sont :

- La formation d'un intermédiaire hémithioacétal où le substrat est fixé de manière covalente avec l'enzyme, suivie d'un transfert d'hydrure qui conduit à l'acylenzyme.
- L'attaque nucléophile du phosphate inorganique sur l'acylenzyme, puis relargage du produit (1,3dPG).

Le phosphate du substrat et le phosphate inorganique se fixent sur la *GAPDH* dans des sites spécifiques, dénommés respectivement P_s et P_i . Cependant, la façon dont ces deux sites contribuent à la fixation des deux groupements phosphates reste encore soumise à controverse. Les études antérieures, réalisées sur les *GAPDH* de différentes sources, ont permis de suggérer des modèles du mécanisme réactionnel chimiquement et structuralement plausibles. Ces derniers ont été proposés sur la base des informations structurales de l'holoenzyme. Il n'y a, cependant, aucune évidence directe sur la validité de ces propositions. Afin de vérifier ces modèles hypothétiques, des évidences structurales directes semblent essentielles. Cependant le complexe ternaire de type $GAPDH/NAD^+/G3P$ est actif. La détermination cristallographique de sa structure est donc difficilement envisageable. Afin de contourner ce problème, la nature du nucléophile essentiel impliqué dans la catalyse enzymatique a été modifiée par ingénierie protéique. La cystéine 149 a tout d'abord été remplacée par un résidu non nucléophile, en l'occurrence une alanine, et ensuite par un résidu moins nucléophile qu'une cystéine, une sérine. Le mutant (C149A) ainsi obtenu est inactif et le mutant (C149S) n'est que très faiblement actif. La *GAPDH* de *B. stearothermophilus* a été choisie comme modèle d'étude structurale, parce que cette enzyme est fortement exprimée dans *E. coli* et que sa structure tridimensionnelle est connue à haute résolution (Skarzynski *et al.*, 1987).

Pour mieux comprendre le mécanisme réactionnel, des études du "site actif" de ces mutants en présence du substrat physiologique ont été entreprises. Durant ce travail, la validité des modèles pour la réaction sera examinée à la lumière des informations obtenues.

Ce mémoire se compose de trois parties distinctes :

La première partie comporte trois chapitres développant les différentes propriétés des sites de reconnaissance anioniques dans les protéines et notamment dans la GAPDH. Le chapitre A-I est une présentation générale des sites anioniques dans les protéines. Une analyse des caractéristiques géométriques structurales des sites de fixation des anions (phosphate et sulfate) permet de faire le point sur la particularité de ces sites dans les différentes protéines. Une revue bibliographique des résultats cristallographiques obtenus sur les GAPDH et une présentation du mécanisme proposé initialement par Segal et Boyer (1953) sont décrits en détail dans le chapitre II. Le chapitre III est consacré à une étude bibliographique des sites anioniques de la GAPDH et des structures des complexes ternaires précédemment résolues.

Dans une seconde partie, après une brève introduction sur les différentes étapes de la résolution d'une structure cristalline, le chapitre IV est consacré à la méthode de cryocristallographie utilisée pour la collecte des données de diffraction.

Les résultats et discussions viennent en dernière partie. Dans le chapitre VI, un modèle moléculaire révisé des événements catalytiques est discuté.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54500 VILLERS-LES-NANCY

Chapitre I

SITES ANIONIQUES DANS LES PROTEINES

Chapitre I : Sites anioniques dans les Protéines

1. Introduction

Depuis l'identification d'anions sulfates dans les cristaux de la α -chymotrypsine (Tulinsky & Wright, 1973), des anions ont été localisés dans de nombreuses structures. Les interactions électrostatiques impliquant un anion jouent un rôle crucial, entre autres, dans la reconnaissance entre protéines et ADN (Pabo & Sauer, 1992), entre enzymes et nucléotides (Wierenga *et al.*, 1985), et entre les partenaires rédox. L'ion phosphate peut augmenter la stabilité de certaines enzymes comme l'aspartate aminotransférase (Martinez-Liarte *et al.*, 1992) et la barnase (Meiering *et al.*, 1991), ou induire le dépôt de métaux comme dans l'apoferritine (Cheng & Chasteen, 1991). Une haute concentration de sulfate conduit à une augmentation de la valeur du pKa de l'His57 dans l' α -lytic protéase (Smith *et al.*, 1989). Ces anions occupent, dans certaines structures, le site de fixation du substrat, et développent des interactions similaires à celles développées par le groupement anionique du substrat. Donc, une analyse des caractéristiques géométriques structurales des sites de fixation des anions (phosphate et sulfate) peut conduire à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques variés.

Une analyse détaillée a été réalisée pour la première fois, par Johnson (1984), sur 30 sites de liaison de phosphate dans 19 protéines de la PDB. L'auteur a départagé ces sites en 2 types : sites destinés exclusivement à la fixation d'un anion (non catalytique) et sites catalytiques. Cette analyse lui a permis d'observer que les sites catalytiques ont des structures moins caractéristiques que les sites de fixation pure, et que l'Arginine est le résidu commun pour le phosphate.

D'autres études plus récentes (Chakrabarti, 1993; Copley & Barton, 1994), sur respectivement 34 et 72 structures de protéines présentes dans la PDB, qui fixent soit un ion phosphate, soit un ion sulfate, ont permis d'analyser la géométrie de fixation de ces anions afin de pouvoir obtenir des renseignements concernant l'importance structurale et fonctionnelle des sites de fixation anionique. L'analyse a permis de mettre en évidence les caractéristiques générales de ces sites : la nature des résidus impliqués, leur type d'interaction

avec les anions, la géométrie des ligands par rapport aux anions et les structures secondaires protéiques impliquées.

Notre propre recherche, à partir de la banque de données des protéines (PDB : (Berman *et al.*, 2000)), des différentes protéines fixant un ou plusieurs ions phosphates ou une molécule contenant un groupement phosphate, nous a permis d'identifier environ 300 structures de protéines, contenant un atome de phosphore comme hétéroatome. Nous avons regroupé ces dernières en différentes familles. Seules les structures de protéines indépendantes, résolues par cristallographie et ayant une résolution supérieure à 3 Å (à l'exception de la Kinase Type I, pour laquelle une seule structure est disponible à 3,2 Å de résolution), ont été retenues. 82 structures de protéines distinctes fixant un ion phosphate ou un composé contenant un groupement pyrophosphate ont donc été retenues dans cette sélection. Elles sont répertoriées dans le tableau I-1.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54500 VILLERS-LEZ-NANCY

Tableau I-1 : Sélection de protéines fixant du phosphate ou une molécule contenant un phosphate.

Code PDB	Nom	Ligands	Résol. (Å)	Val. de R
13PK	3-PHOSPHOGLYCERATE KINASE	3PG, ADP, PO4	2.500	0.220
1A6Q	PHOSPHATASE 2C	PO4	2.000	0.214
1A7K	GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DESHYDROGENASE	PO4	2.800	0.217
1A9O	PENTOSYLTRANSFERASE	PO4	2.000	0.200
1A9X	CARBAMOYL PHOSPHATE SYNTHETASE	ADP, PO4	1.800	0.191
1AG1	TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE	PO4	2.360	0.150
1AJK	D-GLUCAN 4-GLUCANOHYDROLASE	PO4	1.800	0.168
1AKA	ASPARTATE AMINOTRANSFERASE	PLP, PO4	2.100	0.169
1AN5	THYMYDYLATE SYNTHETASE	PO4	2.600	0.193
1AQZ	RESTRICTOCIN	PO4	1.700	0.237
1ARZ	DIHYDRODIPICOLINATE REDUCTASE	PO4	2.600	0.214
1AVQ	LAMBDA EXONUCLEASE	PO4	2.400	0.198
1AXR	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE	PLP, PO4	2.300	0.219
1AZT	GS-ALPHA	GSP, PO4	2.500	0.203
1B4S	NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE	ADP, PO4	2.070	0.164
1B8O	PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE	PO4	1.500	0.184
1BIF	6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE	ATG, PO4	2.000	0.183
1BKJ	NADPH-FLAVIN OXIDOREDUCTASE	PO4	1.800	0.175
1BNC	BIOTIN CARBOXYLASE	PO4	2.400	0.183
1BRL	BACTERIAL LUCIFERASE	PO4	2.400	0.208
1BRW	PYRIMIDINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE	PO4	2.100	0.232
1BZQ	RNASE A	PO4	2.800	0.222
1CDD	PHOSPHORIBOSYLGLYCINAMIDE FORMYLTRANSFERASE	PO4	2.800	0.225
1CLE	CHOLESTEROL ESTERASE	PO4	2.000	0.149
1CMK	CAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE	PO4	2.900	0.233
1CRK	CREATINE KINASE	PO4	3.000	0.217
1CY1	DNA TOPOISOMERASE I	PO4, THP, TMP	2.300	0.242
1D0S	5,6-DIMETHYLBENZIMIDAZOLE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE	PO4	1.900	0.172

Suite du tableau I-1.

<i>Code PDB</i>	<i>Nom</i>	<i>Ligands</i>	<i>Résol. (Å)</i>	<i>Val. de R</i>
1DEA	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE DEAMINASE	PO4	2.100	0.174
1DGK	HEXOKINASE TYPE I	ADP, PO4	2.800	0.260
1DKS	KINASE TYPE I	PO4	3.200	0.183
1DNC	GLUTATHIONE REDUCTASE	FAD, PO4	1.700	0.205
1DNL	PYRIDOXINE 5'-PHOSPHATE OXIDASE	PO4	1.800	21.000
1DPG	GLUCOSE 6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE	PO4	2.000	0.206
1DSY	KINASE C, TYPE ALPHA	PO4	2.600	0.195
1FNB	FERREDOXIN REDUCTASE	PO4, SO4	1.700	0.179
1FPI	FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE	AHG, AMP	2.300	0.199
1FPP	PROTEIN FARNESYLTRANSFERASE	FPP, PO4	2.750	0.230
1FRQ	GLYCEROL KINASE	FAD, PO4, SO4	1.950	0.190
1GLF	HEXOKINASE TYPE I	ADP, PO4	2.620	0.146
1GPM	GMP SYNTHETASE	AMP, PO4	2.200	0.174
1GRB	GLUTATHIONE REDUCTASE	FAD, NDP, PO4	1.850	0.162
1GSN	SULFITE REDUCTASE HEMOPROTEIN	FAD, PO4	1.700	0.207
1HKC	D-GLUCOSE 6-PHOSPHOTRANSFERASE	PO4	2.800	0.174
1HPM	44K ATPASE FRAGMENT	ADP, PO4	1.700	0.205
1IGS	INDOLE-3-GLYCEROLPHOSPHATE SYNTHASE	PO4	2.000	0.177
1IMD	INOSITOL MONOPHOSPHATASE	PO4	2.600	0.188
1JDB	LIGASE	ADP, PO4	2.100	0.179
1NAG	BOVINE PANCREATIC TRYPSIN	PO4	1.850	0.163
1NBM	F1-ATPASE	ADP, ATP, PO4	3.000	0.207
1NIR	NITRITE REDUCTASE	PO4	2.150	0.209
1NSJ	PHOSPHORIBOSYL ANTHRANILATE ISOMERASE	PO4	2.000	0.192
1NZY	4-CHLOROBENZOYL COENZYME A DEHALOGENASE	PO4	1.800	0.188
1PII	N-(5 PHOSPHORIBOSYL)ANTHRANILATE ISOMERASE	PO4	2.000	0.173
1PNT	V-SRC TYROSINE KINASE	PO4	2.200	0.166
1QE5	P-HYDROXYBENZOATE HYDROXYLASE	PO4	2.200	0.200
1QF4	ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE	PO4, RPD	2.200	0.194

Suite du tableau I-1.

<i>Code PDB</i>	<i>Nom</i>	<i>Ligands</i>	<i>Résol. (Å)</i>	<i>Val. de R</i>
1QK3	HYPOXANTHINE-GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE	5GP	1.650	n/a
1RCA	PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE	CGP, PO4	1.900	0.218
1RKD	RIBONUCLEASE	ADP, PO4	1.840	0.220
1RT7	HYPOXANTHINE-GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE	PO4	3	0.258
1RVV	RIBOKINASE	PO4	2.400	0.237
1SGR	SULFHYDRYL OXIDATION	PO4	1.800	0.136
1SHB	YEAST GLYCOGEN PHOSPHORYLASE	PO4	2.000	0.190
1SPR	STREPTOMYCES GRISEUS PROTEINASE B	PO4	2.500	0.185
1SSC	RIBONUCLEASE T1	PO4	2.000	0.166
1TCO	SIGNAL TRANSDUCTION COMPLEX	PO4	2.500	0.195
1TRN	TRYPSIN	ISP, PO4	2.2	0.177
1VDR	DIHYDROFOLATE REDUCTASE	PO4	2.55	0.184
1WGJ	INORGANIC PYROPHOSPHATASE	PO4	2.00	0.172
1XRA	S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE	PO4	3.00	0.189
2ABH	PHOSPHATE-BINDING PROTEIN	PO4	1.7	0.177
2GAR	GLYCINAMIDE RIBONUCLEOTIDE TRANSFORMYLASE	PO4	1.8	0.201
2MTA	METHYLAMINE DEHYDROGENASE	PO4	2.4	0.179
2SKD	PYRIDOXINE 5-PHOSPHATE OXIDASE	PLP, PO4	2.40	0.176
2SNS	DNA-BINDING PROTEIN	PTP	1.5	n/a
3HSC	HEAT-SHOCK COGNATE 70KD 44KD ATPASE	ADP	1.9	0.21
3PFK	PHOSPHOFRUCTOKINASE	PO4	2.4	0.171
3SIL	SIALIDASE	PO4	1.05	0.116
5ENL	ENOLASE	2PG	2.20	0.148
8ATC	ASPARTATE CARBAMOYLTRANSFERASE	PAL	2.5	0.165
8RUB	RUBISCO	CAP	2.4	0.181

Les structures ont été extraites de la banque de données (PDB) (Berman et al., 2000) en Mars 2000. Les abréviations utilisées pour les ligands : **PO4**, Phosphate inorganique ; **3PG**, 3 phosphoglycérate ; **ADP**, Adénosine-5'-Diphosphate ; **PLP**, Phosphate Pyridoxal ; **GSP**,

Guanosine Diphosphate Monothiophosphate ; **ATG**, Adénosine 5'-O-(γ -3-Thiotriphosphate) ; **THP**, Thymidine-5'-Phosphate ; **TMP**, Thymidine-3',5'-Diphosphate ; **FAD**, Flavine-Adénine Dinucléotide ; **SO₄**, ion sulfate ; **AMP**, Adénosine MonoPhosphate ; **AHG**, 2,5-Anhydroglucitole-1,6-Diphosphate ; **FPP**, Farnesyle Diphosphate ; **NDP**, NADPH ; **ATP**, Adénosine-5'-TriPhosphate ; **RPD**, [8,9-dihydroxy-3-(4-carboxy-hydroxy-hydroxyméthyle-amino-butyl)-2,4-dioxo-6-oxa-1,3-diaza-spiro[4.4]non-7-ylméthyle] phosphate ; **5GP**, Guanosine 5'-Monophosphate 2- ; **ISP**, Phosphorylisopropane ; **PTP**, déoxythymidine 3'-5'-biPhosphate ; **2PG**, 2-phospho-d-glycérate ; **PAL**, N-(Phosphonacétyle)-l-aspartate ; **CAP**, 2-carboxyarabinitole-1,5-biPhosphate.

2. Les caractéristiques générales des sites de reconnaissance anionique

Chakrabarti (1993) a remarqué que le nombre de liaisons hydrogène que partagent les oxygènes de l'ion sulfate ou phosphate avec les atomes des ligands est de l'ordre de 7 (± 3), dont 5 (± 3) proviennent de l'interaction directe avec la protéine, les autres étant formées par l'intermédiaire de molécules d'eau. Ces liaisons protéines-anions font intervenir des acides aminés dont la nature dépend des caractéristiques structurales des sites (Copley & Barton, 1994).

Les paramètres géométriques impliquant l'anion ont fait l'objet d'une analyse approfondie (Chakrabarti, 1993), afin de rechercher les directions préférées dans lesquelles l'anion se fixe par rapport au ligand du site. Cette analyse a montré qu'un atome du résidu (donneur de proton : D) peut interagir avec plusieurs atomes d'oxygène (accepteurs de proton : A) de l'oxyanion, entraînant ainsi des types de fixation et des contraintes stériques différentes pour les ligands. On distingue principalement les liaisons du type 1D-1A, 1D-2A ou 1D-3A suivant le nombre d'atomes d'oxygène de l'anion participant aux interactions avec l'atome du ligand. La géométrie conformationnelle entre le donneur et l'(les) accepteur(s) est différente selon la nature de la fixation :

- les interactions de type 1D-1A se font avec un angle de torsion, $L \dots O_i - S/P - O_j$ (où L désigne le ligand ; O_i , l'accepteur de proton ; O_j pouvant être l'un des trois autres atomes d'oxygène de l'anion), de $160-180^\circ$. Ceci suggère une conformation étoilée du ligand par rapport à l'oxyanion (figure I-1.a). Cette géométrie provoque une contrainte stérique moindre entre l'atome du ligand et les trois atomes d'oxygène de l'anion qui ne lui sont pas liés.

- les interactions de type 1D-2A ou 1D-3A suggèrent, par contre, une conformation éclipsée. L'angle de torsion est proche de 120° . Dans cette géométrie, l'atome du ligand éclipse un des atomes d'oxygène de l'anion phosphate ou sulfate avec lequel il interagit pour former des liaisons hydrogène (figure I-1.b).

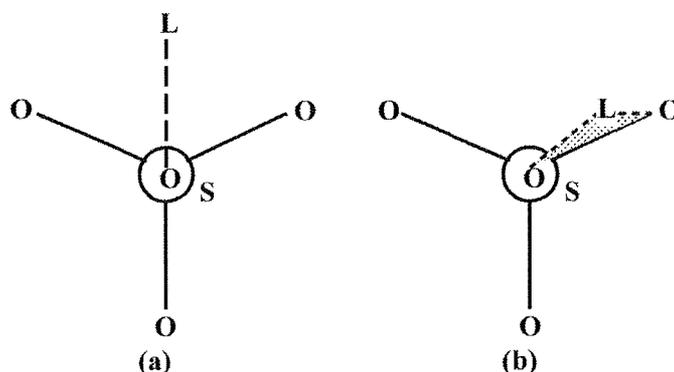


Figure I-1: Projection de Newmann suivant O-S montrant 2 conformations limites : (a) étoilée et (b) éclipsée, du ligand par rapport au SO₄ tétraédrique. Le premier possède une liaison hydrogène, et le deuxième 2 liaisons hydrogène liant le ligand à l'anion (d'après Chakrabarti, 1993).

Pour chaque point d'ancrage considéré, selon le nombre de ligands partenaires mis en jeu dans l'interaction avec un ou plusieurs atomes accepteurs de l'anion, on distingue des interactions de type binaire (un ligand partenaire) (figure I-2), ternaire (deux ligands), quaternaire (trois ligands) (figure I-3).

Pour chaque type d'interaction, la fixation des anions fait intervenir différents motifs de liaisons hydrogène. Les interactions de type binaires comprennent 2 (ou 3 dans très peu de cas) liaisons hydrogène entre un donneur de protons (un ou plusieurs) d'un ligand et les atomes d'oxygène de l'anion. Ceci a pour résultat la formation de structures cycliques à 4 (figure I-2.a1), 6 (figure I-2.c1) ou 8 (figure I-2.f3) membres, permettant ainsi d'obtenir des associations étroites entre la protéine et l'anion.

La figure I-2 montre les différentes structures cycliques de type binaire rencontrées. Les motifs sont représentés par une combinaison formée d'une lettre et d'un nombre. La lettre est indicative du type de ligand protéique (ou eau), alors que les numéros représentent le nombre d'atomes d'oxygène anioniques qui participent aux liaisons. Les structures de type **a** sont formées par les chaînes latérales du carboxamide ou guanidinium ; **b**, par les molécules

d'eau ; **c**, par la chaîne latérale de l'Arg ; **d**, par la chaîne latérale d'une His ; **e**, par la chaîne latérale de la Ser, Thr, Tyr ou une molécule d'eau ; et **f**, par une Lys.

Les interactions de type ternaire sont formées le plus souvent avec un groupement hydroxyle comme troisième composante. La figure I-3 présente différentes structures cycliques formées par des interactions ternaires. Dans la figure I-3.a, l'accepteur de proton est un atome d'oxygène de l'anion, les deux donneurs sont un groupement NH du guanidinium d'une arginine et un groupement hydroxyle (Ser, Thr, ou une molécule d'eau). La structure cyclique est obtenue par une dernière interaction entre le groupement hydroxyle et un groupement NH du guanidinium (figure I-3.a). Une telle structure est rencontrée par exemple dans le site actif de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (1GD1), où les ligands impliqués sont l'Arg231 et la Thr179. De même, deux groupements hydroxyle peuvent remplacer l'Arg du système ternaire précédent (figure I-3.b). Ce type d'interaction est rencontré par exemple dans le centre de réaction photosynthétique (1PRC : Ser54, HOH544) et dans la malate déshydrogénase cytoplasmique (4MDH : Ser241, HOH408). La figure I-3.c, représente le cas d'un système de type quaternaire formé par les atomes d'oxygène de l'anion sulfate et trois molécules d'eau, formant un réseau entre elles. Un tel cas de figure est rencontré par exemple dans la α -Lytic Protéase (2ALP : HOH33, HOH106, HOH120).

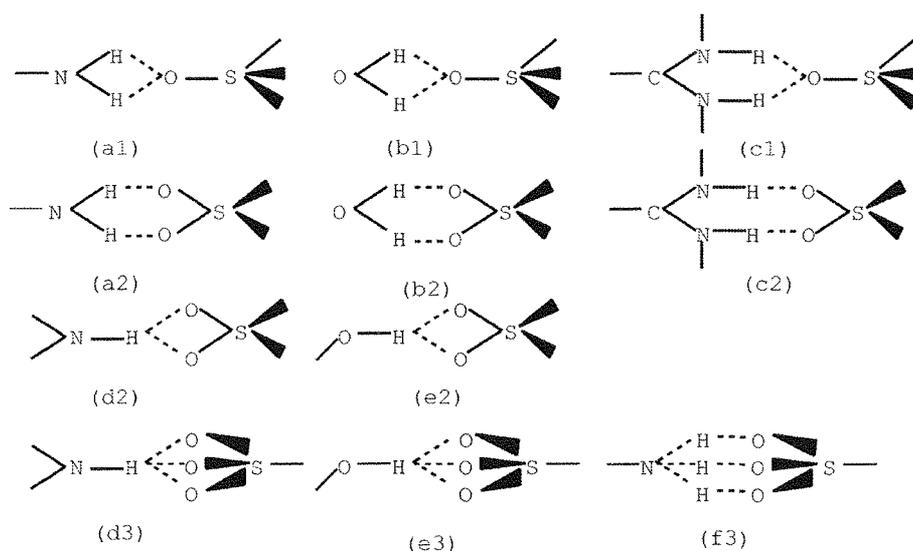


Figure I-2 : Structures cycliques formées par 2 ou plusieurs liaisons hydrogène (parallèles ou convergentes) impliquant des anions (d'après Chakrabarti, 1993).

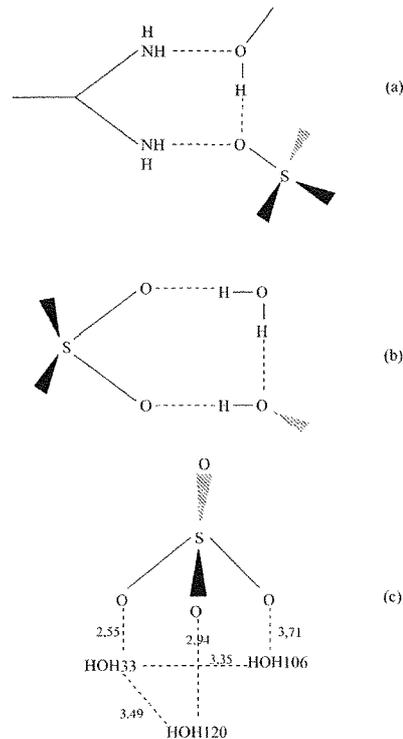


Figure I-3 : Représentation schématique des structures cycliques des liaisons hydrogène des différents types d'interactions formées : (a) par un système ternaire anion-Arg-Thr, (b) par un système ternaire anion-molécule d'eau-groupe hydroxyle ou (c) par un système quaternaire formé par un anion et un réseau de molécules d'eau (d'après (Chakrabarti, 1993)).

3. Les caractéristiques des sites de fixation du phosphate

Les ions sulfates sont moins fréquemment impliqués dans des rôles fonctionnels spécifiques que les groupements phosphates. Ainsi, les sites de fixation de ces premiers ont un intérêt biochimique limité. Par conséquent, les parties suivantes seront consacrées principalement aux interactions des ligands contenant un groupement phosphate. Nous essaierons d'identifier les caractéristiques structurales nécessaires pour la fixation du phosphate, les acides aminés les plus fréquemment rencontrés dans les sites de fixation et la conservation des résidus fixant le phosphate durant l'évolution des protéines.

3. 1. Les différents types de sites de fixation des groupements phosphates

Les groupements phosphates sont chargés négativement. Ils sont donc supposés être fixés dans une région de potentiel électrostatique positif dans la protéine. Il a été suggéré que ce rôle peut être rempli par la chaîne latérale chargée positivement de certains acides aminés, par le caractère dipolaire de la liaison peptidique, par le macrodipôle d'une hélice α (Hol, 1985; Hol *et al.*, 1978) ou par une contribution des trois.

Les pyrophosphates du nucléotide, rencontré dans toutes les protéines à cofacteur nucléotidique, sont tous fixés près de l'extrémité N-terminale des hélices α (Baker *et al.*, 1992; Wierenga *et al.*, 1985; Wierenga *et al.*, 1986). De telles structures semblent confirmer l'hypothèse du macrodipôle d'hélice. Cependant, l'importance générale du macrodipôle d'hélice dans la stabilisation de la fixation anionique a été remise en question par les études sur la SBP (Sulfate Binding Protein) (He & Quioco, 1993). Dans la SBP, la stabilisation serait conférée par les unités peptidiques confinées dans la première partie de l'hélice α . Le macrodipôle de cette hélice ne joue aucun rôle significatif (He & Quioco, 1993; Ledvina *et al.*, 1996). L'importance du macrodipôle des hélices pour la fixation anionique reste ainsi un sujet à débattre.

Les sites de fixation du phosphate peuvent en général être classifiés en deux types : les sites à hélice et les sites sans hélice (Copley & Barton, 1994). Notre analyse des sites de fixation anionique des protéines fixant un ou plusieurs groupements phosphates, répertoriés dans le tableau I-1 conforte l'hypothèse de l'existence de ces types de sites de fixation.

Certains groupements phosphate ont été identifiés à l'extrémité N-terminale des hélices de type 3_{10} . Dans ce type de sites à hélice 3_{10} , les liaisons hydrogène stabilisant la structure 3_{10} de l'hélice sont faibles et les dipôles peptidiques ne sont pas alignés. Ce non-alignement empêche l'existence d'un macrodipôle d'hélice influant et ainsi, la fixation du phosphate par ces structures ne relèverait pas de la théorie du macrodipôle de l'hélice (Copley & Barton, 1994). Le rôle de l'hélice 3_{10} dans ce type de site de fixation serait de permettre aux multiples atomes d'azote de la chaîne principale de fixer le groupement phosphate. Ainsi, l'effet de la stabilisation de l'hélice se limite à créer une conformation favorable de la chaîne polypeptidique, de telle façon que le phosphate fixé puisse interagir avec les dipôles des peptides individuels.

3. 2. Les interactions des phosphates avec les sites de fixation

Le nombre de résidus distincts impliqués directement dans des interactions avec un groupement phosphate varie de 0 (1csc : Citrate synthase et 1rnd : Ribonuclease A) à 7 (Copley & Barton, 1994). En effet, il n'y a pas un nombre critique de contacts nécessaires pour fixer un groupement phosphate. Le nombre moyen de liaisons hydrogènes dans les sites de fixation des groupements phosphates est de 3,5 avec une déviation standard de 2,3. La distribution des contacts pour les deux types de sites (à hélice et sans hélice) est similaire. Aussi n'y-a-t-il aucune corrélation marquante entre le nombre de ces contacts et le type du phosphate (un phosphate libre, un phosphate en position terminale d'une molécule ou un groupement pyrophosphate) (Copley & Barton, 1994).

3. 3. Acides aminés rencontrés préférentiellement dans les sites de fixation de phosphate

Outre les groupements NH de la chaîne principale, tout résidu possédant un donneur de proton dans la chaîne latérale peut interagir avec un anion. Les arginies et les groupements peptidiques des chaînes principales sont les ligands les plus souvent rencontrés dans les sites de fixation anioniques. Ces deux ligands permettent une association très étroite entre la protéine et les groupements anioniques. En effet, les premiers peuvent former des interactions multiples avec les anions et les seconds permettent d'orienter la liaison. Le résidu le plus fréquemment rencontré dans les sites de fixation contenant des hélices est la Gly (chaîne principale) suivie par l'Arg, Thr, Ser et Lys (chaîne latérale). Dans les sites de fixation sans hélice, le résidu le plus fréquemment rencontré est l'Arg suivie par la Thr, His, Lys et Ser.

3. 4. Le voisinage séquentiel des ligands

L'interaction d'un anion avec un ligand peptidique (NH) entraîne le rapprochement de l'anion de la chaîne principale et limite le type d'acides aminés adjacents à ce ligand peptidique. Le résidu le plus souvent rencontré est la glycine. La séquence peptidique X-Gly-Y (où X et Y peuvent être des acides aminés quelconques, mais sont le plus souvent une Gly, Ser, Thr ou Ala en première position et Gly ou Ala en troisième position) permet, semble-t-il, une structure idéale pour la fixation anionique. Dans ce cas, le motif X-Gly constitue un ligand de l'anion. De plus, les atomes de la chaîne latérale du résidu X et/ou du groupement peptidique Gly-Y, peuvent aussi former des liaisons avec ce même anion. Par conséquent, la Gly (quelquefois en association avec un résidu comme la Ser) est très ubiquitaire dans les

sites de fixation anioniques. Par exemple, le site oxyanion qui stabilise l'intermédiaire tétraédrique dans la réaction catalysée par la chymotrypsine implique le groupement NH de la chaîne principale de la Gly193 (Kraut, 1977).

3. 5. La conservation des sites de fixation des groupements phosphate

Par des alignements multiples de séquences protéiques déposées dans la banque de donnée des protéines (PDB), Copley et Barton (Copley & Barton, 1994) ont constaté que la conservation des résidus participant à la formation d'un site anionique, en général, est supérieure à la moyenne de conservation des autres résidus de la protéine. De plus, les sites de fixation du phosphate sont beaucoup plus conservés que les sites de fixation du sulfate. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les sites anioniques liant des phosphates ont souvent une importance fonctionnelle pour la protéine, tandis que ceux des sulfates n'en ont pas.

Chapitre II

LA GLYCERALDEHYDE-3- PHOSPATE DESHYDROGENASE

Chapitre II : La Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase phosphorylante

II. 1. Les différentes classes de GAPDH

La *D*-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH : EC 1.2.1.12) est une enzyme ubiquitaire dans le monde vivant. Elle appartient à la famille des aldéhydes déshydrogénases à cofacteur NAD(P). Les GAPDH se répartissent en trois classes, qui se distinguent par leur rôle biologique, leur localisation cellulaire et leur spécificité pour le cofacteur.

- 1- **La GAPDH glycolytique** (EC 1.2.1.12) catalyse de manière réversible la phosphorylation oxydative du *D*-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en acide 1,3 diphosphoglycérique (1,3dPG) et utilise spécifiquement le *NAD* comme cofacteur pour les enzymes isolées d'eubactéries et d'eucaryotes (Harris & Waters, 1976).
- 2- **La GAPDH chloroplastique** (EC 1.2.1.13) catalyse la déphosphorylation réductive du 1,3dPG en *D*-G3P (Cerff, 1978; Ferri *et al.*, 1978; Levy & Betts, 1989). Elle est présente dans les stroma des chloroplastes des organismes photosynthétiques. Cette GAPDH présente une dualité de spécificité de cofacteur, avec une préférence pour le NADPH par rapport au NADH (Ferri *et al.*, 1978) (ce qui est cohérent avec son rôle dans une voie anabolique).
- 3- **La GAPDH cytosolique non phosphorylante** (EC 1.2.1.9) catalyse l'oxydation irréversible du *glycéraldéhyde-3-phosphate* en *3-phosphoglycérate* en présence du cofacteur NADP et d'une molécule d'eau (Iglesias & Losada, 1988; Iglesias *et al.*, 1987).

Les deux premières GAPDH ont des activités *phosphorylantes* alors que la troisième est dite *non phosphorylante*. Les séquences des GAPDH non phosphorylantes ne présentent pas d'homologie avec les séquences des GAPDH phosphorylantes. Cependant, elles présentent une identité de séquence de 30% (Boyd *et al.*, 1995; Habenicht *et al.*, 1994; Lui *et al.*, 1997; Michels *et al.*, 1994; Steinmetz *et al.*, 1997) avec les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) pour lesquelles 11 structures ont été récemment résolues (Abe *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999; Cobessi *et al.*, 1999; Hadfield *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1998; Lamb & Newcomer, 1999;

Liu et al., 1997; Moore *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1999; Steinmetz et al., 1997; Yang *et al.*, 1997). Les GAPDH non phosphorylantes appartiennent à une classe structurale clairement distincte des deux GAPDH phosphorylantes, et s'apparentent structuralement à certaines ALDH (Cobessi et al., 1999)

Les *GAPDH* des archae se distinguent par leur faible homologie de séquence avec les *GAPDH* d'eubactéries et d'eucaryotes (16-20%) et leur spécificité de cofacteur. On trouve des *GAPDH* d'archaes qui présentent une dualité de spécificité de cofacteur (NAD^+ et $NADP^+$), comme la *GAPDH* de *Methanothermus fervidus* (Charron *et al.*, 1999; Fabry *et al.*, 1988) et d'autres strictement NAD^+ dépendantes, comme dans le cas de l'enzyme de *Haloarcula vallismortis* (Prüb *et al.*, 1993). Cependant, la plupart des *GAPDH* phosphorylantes isolées d'archaes sont à dualité de cofacteur avec, une préférence pour le NADP (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993). Les premières structures ont été déterminées très récemment (Charron et al., 1999; Isupov *et al.*, 1999).

Par la suite, nous nous intéresserons essentiellement aux *GAPDH* phosphorylantes glycolytiques d'eubactéries et d'eucaryotes, et plus particulièrement à la *GAPDH* de *B. stearotherophilus* sur laquelle a porté notre étude.

II. 2. Rôle enzymatique de la *GAPDH* glycolytique

L'enzyme *D*-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*: EC 1.2.1.12) catalyse de manière réversible l'oxydation et la phosphorylation du *D*-glycéraldéhyde-3-phosphate (*D*-*G3P*) en acide 1,3-diphosphoglycérique (*1,3dPG*), en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide NAD^+ comme cofacteur et le phosphate inorganique (HPO_4^{2-}) (figure II-1).

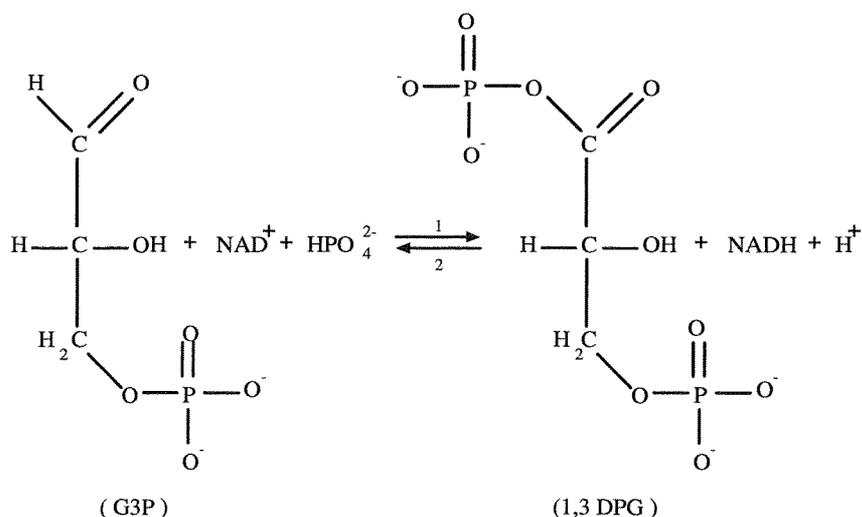


Figure II-1 : Réaction catalytique de la *GAPDH*

La *GAPDH* est une enzyme clé dans la glycolyse et dans la néoglucogenèse, la voie inverse de la glycolyse. Dans la direction *glycolytique*, le substrat *G3P* est un produit de l'*aldolase* et de la *triose phosphate isomérase (TIM)*. Le produit 1,3dPG est utilisé par la *phosphoglycérate kinase (PGK : EC 1.7.23)* dans la première étape de génération de l'ATP, dans la glycolyse.

II. 3. Structure de la *GAPDH* glycolytique

II. 3. 1. Structure primaire

L'alignement des séquences protéiques de *GAPDH* actuellement connues montre l'existence d'une forte identité entre elles, à l'exception des séquences de *GAPDH* d'archaées. Les structures primaires des enzymes glycolytiques et chloroplastiques, issues des organismes eucaryotes et/ou des eubactéries sont très homologues entre elles (au minimum 40% d'identité), alors que celles des archaées divergent fortement par rapport aux précédentes (environ 15% d'identité seulement), tout en formant entre elles une famille homogène (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993 ; Martin *et al.*, 1993).

II. 3. 2. Structure tridimensionnelle

II. 3. 2. a- Structure globale

La *GAPDH* glycolytique phosphorylante NAD dépendante est une enzyme homotétramérique, avec des sous-unités de masse moléculaire allant de 34000 à 38000 *Daltons*. Chacune des sous-unités fixe le cofacteur NAD^+ d'une manière coopérative. Cependant, cette coopérativité dépend de la source de l'enzyme (Corbier *et al.*, 1990a ; Kirschner *et al.*, 1971).

La structure du tétramère est décrite dans un système de coordonnées orthogonales d'axes P, Q, R (figure II-2.a et II-2.b), défini par Rossmann pour la *LDH* (Rossmann *et al.*, 1973). Le tétramère révèle une symétrie 222 apparente, *i.e.* au monomère O on fait correspondre, par ce système d'axes P, Q et R, respectivement les monomères P, Q et R.

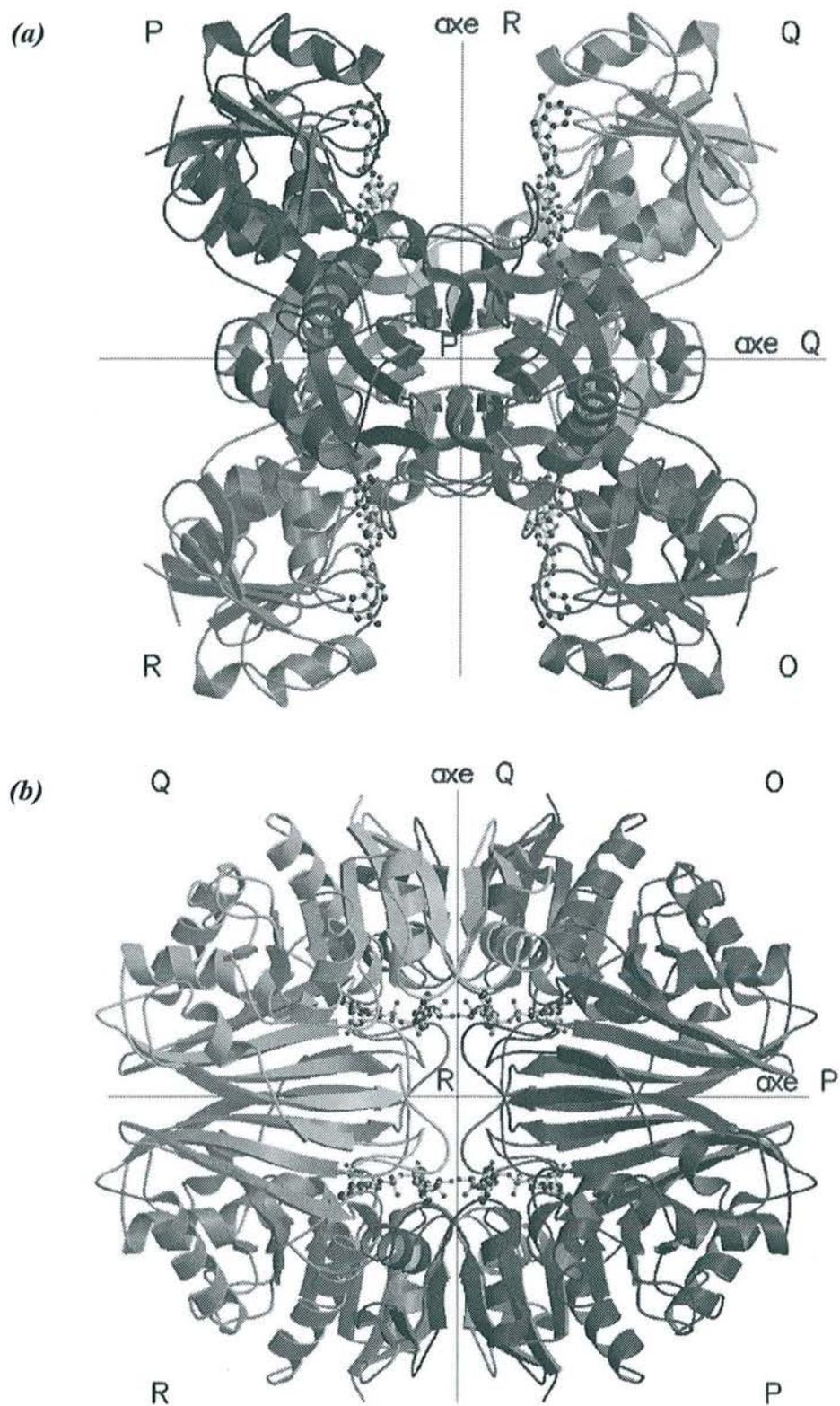


Figure II-2 : Représentation en ruban de la chaîne principale du tétramère de la GAPDH de *B. stearothermophilus* vue le long de deux axes binaires de la molécule : axe **P** en (a) et axe **R** en (b).

La première structure cristallographique a été déterminée à partir de cristaux d'enzyme de muscle de homard, sous la forme holoenzyme (Watson & Banaszak, 1964). Ces cristaux appartiennent à un groupe d'espace orthorhombique ($P2_12_12_1$), avec un tétramère par unité asymétrique. Des études plus détaillées, réalisées sur cette enzyme par Rossmann et collaborateurs (Buehner *et al.*, 1974 ; Moras *et al.*, 1975 ; Rossmann *et al.*, 1974), ont permis de déterminer et d'interpréter la première structure à haute résolution. Actuellement dix structures distinctes de GAPDH sont connues. La structure cristalline sous forme apoenzyme a également été résolue pour la GAPDH du homard (Murthy *et al.*, 1980), de *B. stearothermophilus* (Skarzynski & Wonacott, 1988) et de *Sulfolobus Solfataricus* (Isupov *et al.*, 1999).

II. 3. 2. b- Structure du monomère

Un monomère est composé de 330 acides aminés environ. Il est constitué de deux domaines, chacun ayant une fonction spécifique. Le premier, comprenant les résidus 1-148 et 312-333, est impliqué principalement dans la fixation du NAD^+ tandis que le second, dit domaine 'catalytique', comprenant les résidus 149-311, possède les résidus impliqués dans la fixation du substrat et les acides aminés essentiels à la catalyse. Le domaine catalytique contient aussi la plupart des résidus intervenant dans les contacts entre monomères (figure II-3).

Domaine de fixation du cofacteur NAD^+

Ce domaine est constitué de 148 acides aminés du côté N-terminal, ainsi que des résidus 312 à 333 du côté C-terminal (figure II-4). Ces derniers résidus, forment une hélice α (α_4) qui vient se replier sur le domaine pour former un contact direct avec le cofacteur NAD^+ . La partie N-terminale se compose de quatre hélices α (α_B , α_C , α_D et α_E) et de neuf brins β formant un grand feuillet parallèle (brins β_A , β_B , β' , β'' , β_C , β_D , β_E , β_F et β_G). Le feuillet β central n'est pas plan, mais présente une torsion de 100° entre les brins β_C et β_F , ce qui constitue une structure thermodynamiquement stable (Rao & Rossmann, 1973). Ainsi, le motif $\beta_A \alpha_B \beta_B \alpha_C \beta_C$ fixe la partie adénosine du NAD^+ et le motif $\beta_D \alpha_E \beta_E \alpha_4 \beta_F$ fixe la partie nicotinamide mononucléotide.

Ce repliement $\beta \alpha \beta \alpha \beta$ représente un motif caractéristique des sites de fixation de cofacteur des déshydrogénases appelé '*repliement de Rossmann*' (Rossmann *et al.*, 1974).

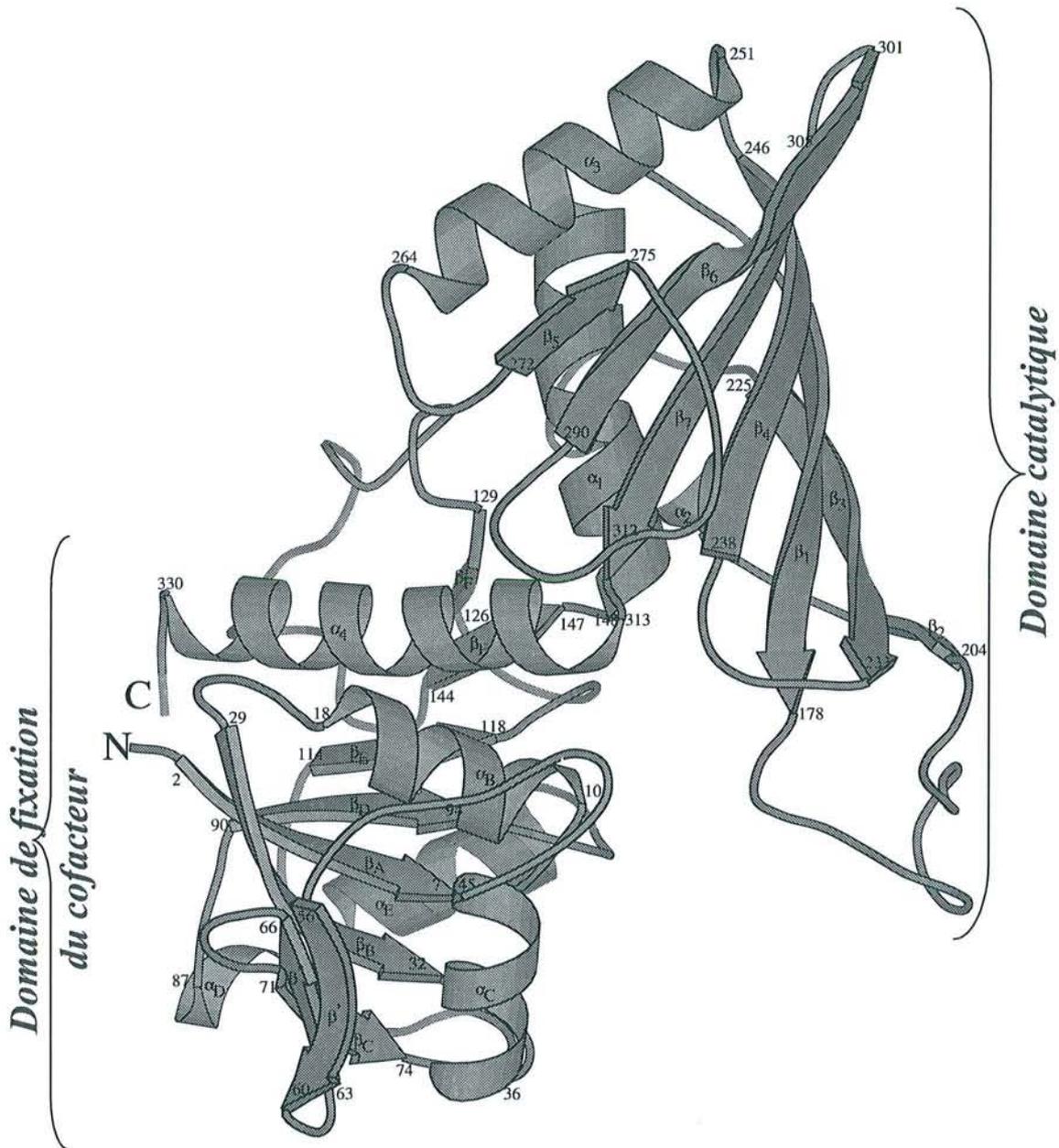


Figure II-3 : Représentation en ruban de monomère de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

A - Le sous-site de fixation de l'adénosine

Dans l'holoenzyme, l'adénine est enfouie dans une poche hydrophobe formée entre autres par les chaînes latérales de la Leu33 et de la Thr96. Elle est stabilisée par une liaison hydrogène entre son groupement NH_2 en position 6 (N6A) et le carbonyle peptidique de l'Arg77 (figure II-5). Le ribose est stabilisé par deux liaisons hydrogènes entre ses deux groupements OH en position 2' et 3' et les oxygènes du carboxylate de la chaîne latérale de l'Asp32 (résidu quasi invariant participant à la spécificité pour le NAD^+).

Le pyrophosphate est stabilisé par interaction électrostatique avec la charge positive générée par le macrodipôle de l'hélice α_B (Wierenga et al., 1985), par deux liaisons entre les atomes O2A et O2N et les NH peptidiques des résidus Arg10 et Ile11, ainsi que par une liaison hydrogène entre l'atome O2A et le NH de la chaîne latérale de l'Asn180.

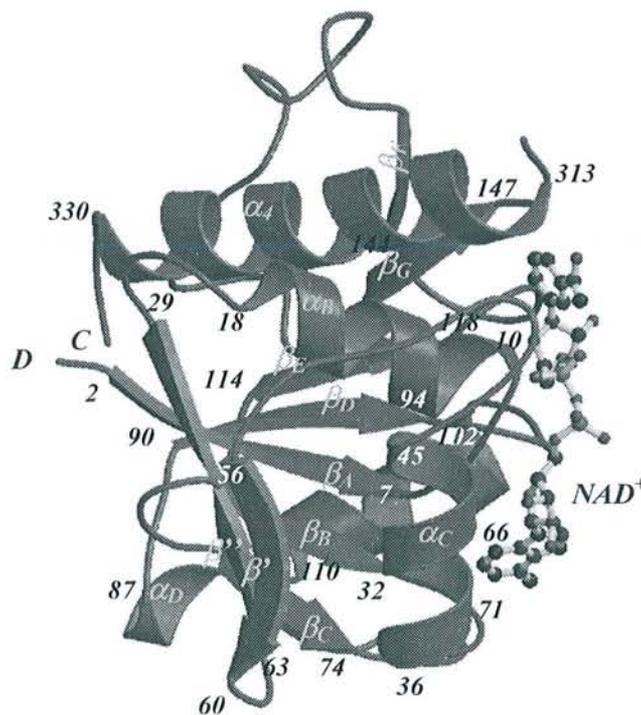


Figure II-4 : Représentation en ruban du domaine de fixation du cofacteur avec la nomenclature de la structure secondaire.

B - Le sous-site de nicotinamide

Le groupe nicotinamide est situé près du site actif, enfoui à l'intérieur du tétramère. Il est impliqué dans une liaison directe avec la protéine. Cette liaison est formée par l'atome d'oxygène du carboxamide et par l'atome N_{δ2} du résidu conservé Asn313. Le cycle pyridinium du nicotinamide prend part à des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales des résidus conservés Ile11 et Thr317 de la même sous-unité.

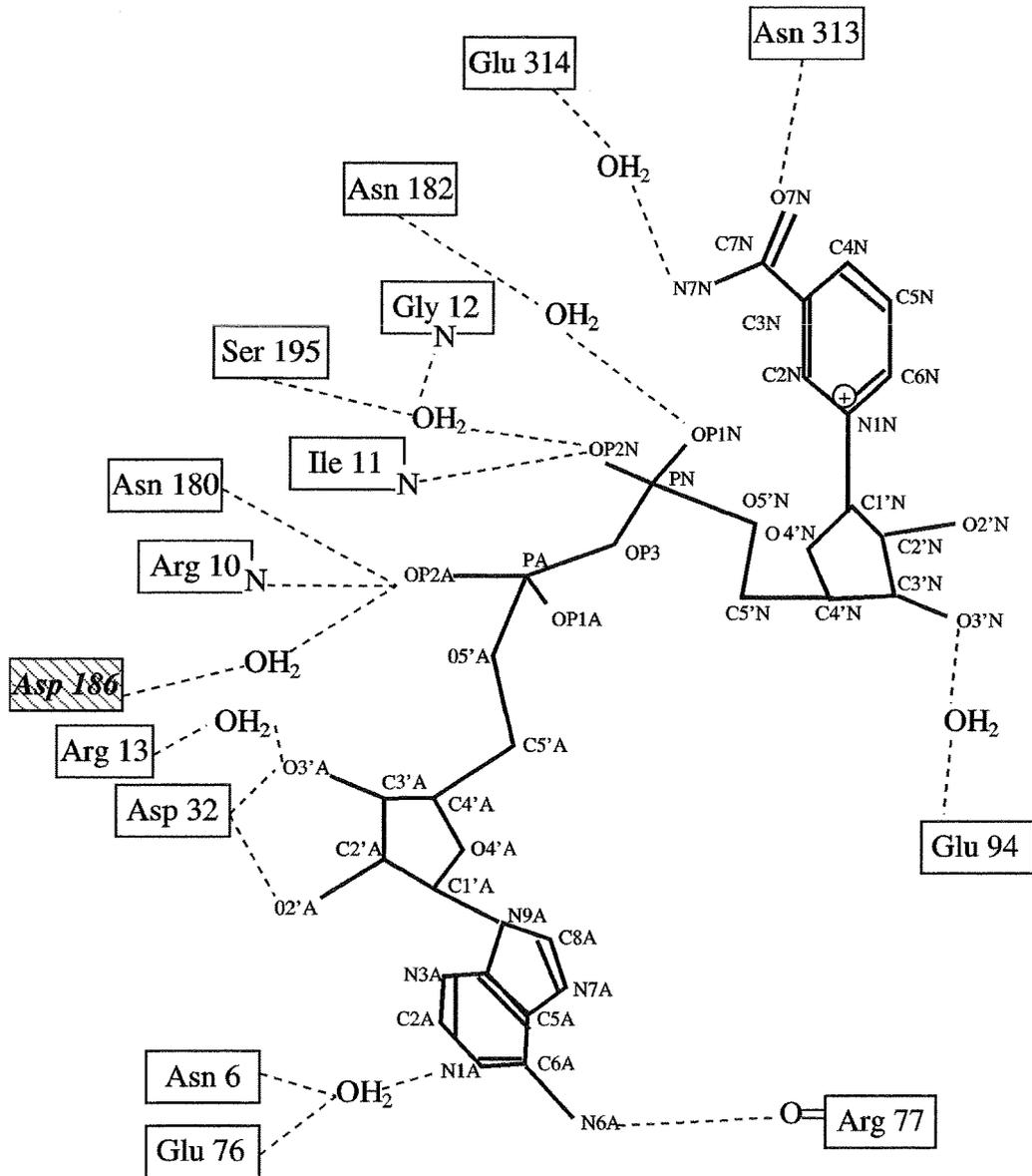


Figure II-5 : Fixation du cofacteur NAD⁺ dans la GAPDH de *B. stearothermophilus*. Le résidu en hachuré appartient à la sous-unité adjacente. (Schéma réalisé d'après les données de Skarzynski et al., 1987)

Cette partie du cofacteur NAD est essentielle pour le transfert d'hydrure ($H^+ + 2e^-$) entre l'intermédiaire thiohémiacétal et l'atome C4N du cycle du nicotinamide, et son positionnement correct est indispensable pour assurer l'efficacité de la catalyse.

Le transfert d'hydrure est extrêmement stéréospécifique dans les enzymes de type sauvage agissant sur les substrats naturels (Benner *et al.*, 1989 ; Creighton & Murphy, 1990 ; Duée *et al.*, 1996 ; Eyschen *et al.*, 1999 ; LaReau & Anderson, 1989 ; Weinhold *et al.*, 1991 ; You, 1982). Ainsi, la famille des déshydrogénases peut être divisée en deux classes : celle qui transfère l'hydrogène *pro-R* et celle qui transfère l'hydrogène *Pro-S* en C4N du cycle pyridinium. Ce sont respectivement les enzymes des classes A et B.

Une telle stéréospécificité est directement liée à la conformation adoptée par la partie nicotinamide dans le site : les déshydrogénases de classe A fixent le NAD(P) avec une conformation *anti* autour de la liaison glycosidique entre le nicotinamide et le ribose, tandis que les déshydrogénases de classe B utilisent le proton *Pro-S* du NADH et lient le coenzyme avec une conformation *syn* (figure II-6). Les conformations *syn* et *anti* du nicotinamide par rapport au ribose sont définies par l'angle de torsion χ_N (O4'N-C1'N-N1N-C2N). Dans la disposition *anti*, $\chi_N = 180 \pm 90^\circ$ et dans la disposition *syn* $\chi_N = 0 \pm 90^\circ$ (Eyschen *et al.*, 1999).

La GAPDH glycolytique NAD⁺ dépendante (EC 1.2.1.12) a une spécificité B, transférant ainsi le proton *Pro-S* en position C4N du cycle dihydronicotinamide orienté dans la conformation *syn*. Cette dernière est stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire entre les atomes N7N et OP1N.

Trois atomes de carbone du cycle nicotinamide sont en contact avec des atomes d'oxygène voisins (C6N...O₇-Ser 119, C2N...O5'N et C4N...O₈₂-Asn 313). L'arrangement de ces trois atomes d'oxygène proches et dans le plan du cycle du nicotinamide stabiliserait ce cycle durant la catalyse (Filman *et al.*, 1982).

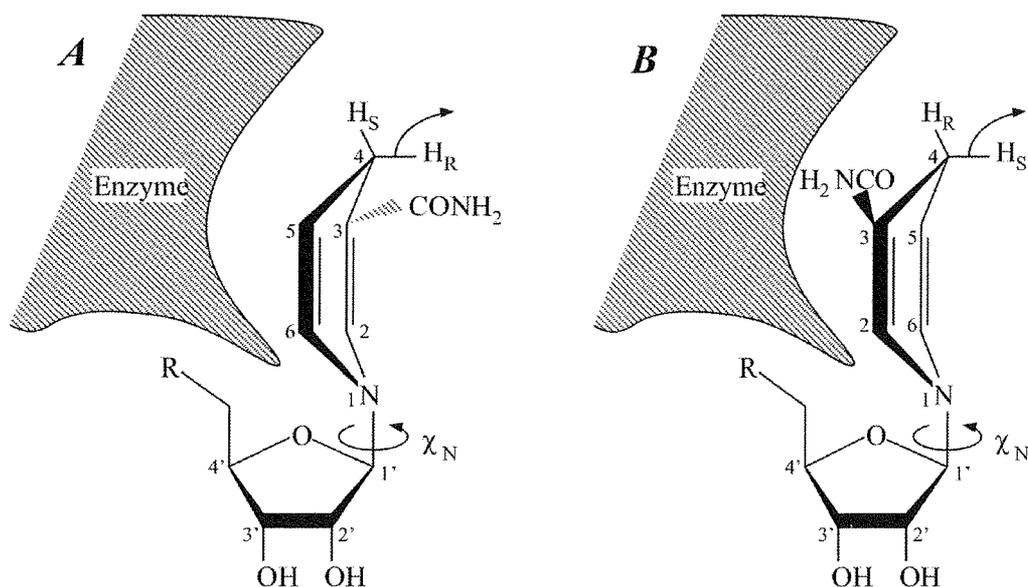


Figure II-6 : corrélation entre la spécificité du transfert d'hydrure et la conformation du nicotinamide. (A) les déshydrogénases classe A catalysent le transfert d'hydrure de l'hydrogène pro-R et fixent la conformation anti du NADH. (B) les déshydrogénases classe B catalysent le transfert d'hydrure de l'hydrogène pro-S et fixent la conformation syn du NADH. Le transfert d'hydrure est facilité par la conformation bateau adoptée par le cycle du pyridinium dans l'état de transition (d'après Eyschen et al., 1999).

C - transition apo-holo

La fixation du NAD sur la GAPDH provoque d'importants changements conformationnels, qui ont été identifiés à partir de l'analyse à haute résolution des différences structurales entre la forme holoenzyme et la forme apoenzyme de *B. stearothermophilus*. Ces travaux ont permis d'établir le mécanisme probable de la fixation du coenzyme sur une sous-unité. Globalement, la formation de la structure holo nécessite l'intégralité de la molécule de coenzyme (figure II-5).

Le mécanisme proposé est le suivant (Skarzynski & Wonacott, 1988) : la partie adénine phosphate (ADP) se fixe en premier sur l'apoenzyme ; l'adénine développe alors des interactions avec la Thr96, la Leu33, et également avec la Pro188 appartenant à la sous-unité adjacente. L'Asp32, résidu invariant chez de nombreuses déshydrogénases, forme une liaison hydrogène avec le ribose adjacent à l'adénine, alors que le groupement pyrophosphate forme deux liaisons hydrogènes avec les chaînes principales de l'Arg10 et de l'Ile11. La fixation de l'ADP s'effectue sans changement conformationnel notable de la structure de l'apoenzyme. Cependant, elle permet d'orienter la molécule de NAD de façon à ce que la partie nicotinamide puisse bénéficier d'interactions favorables avec le reste de la structure protéique.

Pour que ces interactions soient réalisables, la molécule de NAD doit s'enfoncer plus profondément dans le site actif, ce qui requiert un mouvement de la plus grande partie du domaine de fixation du coenzyme.

Globalement, l'Asp32 et la Leu33 changent de conformation : l'Asp32 peut alors interagir par une liaison hydrogène avec les deux OH du ribose adjacent à l'adénine tandis que la Leu33 renforce son interaction hydrophobe avec l'adénine. La chaîne latérale de l'Ile11 change également de conformation et de position, permettant au nicotinamide de se rapprocher de l'Asn313 et de former une liaison hydrogène, de par le C=O de la fonction amide en C₃, avec le NH₂ de la fonction amide de l'Asn313. La Ser119 se rapproche également du ribose adjacent au nicotinamide pour former une liaison hydrogène avec le OH en 2' du ribose. La partie adénosine et son site suivent le noyau nicotinamidium dans son mouvement vers l'Asn313, acide aminé dont la position reste fixe au cours de ce réarrangement. Ce mouvement permet de générer des contacts optimum entre la partie nicotinamide et la protéine (interactions hydrophobes du noyau pyridinium avec la Tyr317 et la chaîne latérale de l'Ile11, liaison hydrogène entre la Ser119 et l'Asn313). Il permet également de renforcer les interactions de la partie ADP avec son sous-site.

Ces changements conformationnels induits par la fixation du NAD ont pu être confirmés en utilisant des analogues du NAD⁺. La fixation du NAD, du NADH ou de l'adénosine diphosphoribose, cause la destruction des cristaux de l'apoenzyme de *B. stearothermophilus*, à l'inverse de l'AMP et de l'ADP. De plus la totalité du NAD, et en particulier le nicotinamidium, semble indispensable à l'obtention d'un changement conformationnel maximum conduisant à une structure " holo active".

D – Conséquences de ce changement conformationnel au niveau de la catalyse

Le changement conformationnel provoqué par la fixation du NAD entraîne des conséquences au niveau du domaine catalytique.

- Il permet le rapprochement entre les deux acides aminés catalytiques : Cys149 et His176 (distance 3,96 Å pour la forme apoenzyme ; 3,63 Å pour la forme holoenzyme) favorisant ainsi la formation d'une paire d'ions. Cette liaison ionique augmente la nucléophilie de la Cys149 et aide à la stabilisation de la charge positive du nicotinamide grâce à la polarisation négative partielle de l'atome de soufre de la Cys149.
- Au niveau des deux sites de reconnaissance anionique Pi et Ps, la présence de la molécule de NAD et le mouvement des résidus impliqués renforcent l'efficacité de fixation de ces sites. C'est ainsi que dans l'apoenzyme, le taux

d'occupation des sites par les ions sulfate est plus faible que dans l'holoenzyme (Skarzynski & Wonacott, 1988).

Le changement conformationnel contribue donc à la formation des sites de reconnaissance anionique "productifs".

Domaine catalytique

Ce domaine est constitué des résidus 149 à 310 qui forment un feuillet β central de 7 brins antiparallèles (brins β_1 à β_7) auquel viennent s'ajouter 3 hélices α (α_1 , α_2 et α_3) et une longue boucle peu structurée, la 'S-loop' (résidus 178 à 204). Cette boucle à caractère hydrophobe est présente à l'interface des sous-unités dans le tétramère. Elle assure en partie la formation et le maintien de la structure quaternaire de l'enzyme et est impliquée dans la spécificité du coenzyme par son interaction avec le coenzyme grâce aux résidus Leu 187 et Pro 188 (Corbier et al., 1990a ; Skarzynski et al., 1987).

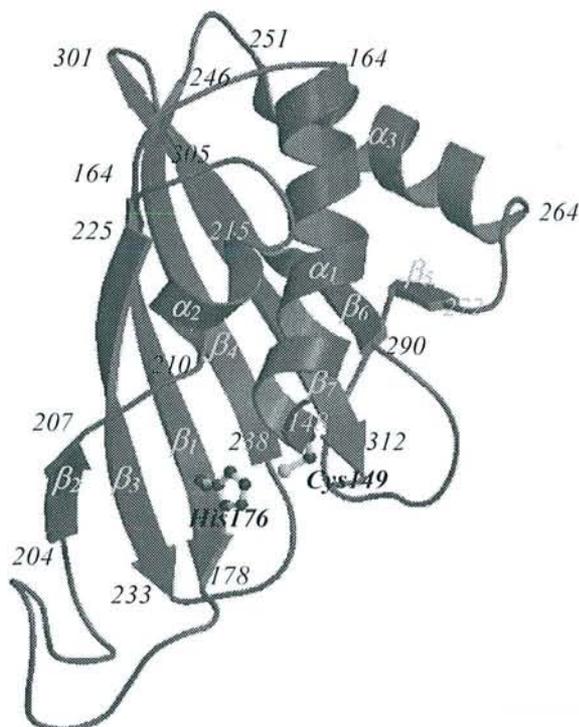


Figure II-7 : Représentation en ruban du domaine catalytique avec la nomenclature de la structure secondaire, ainsi que les structures atomiques des résidus catalytiques His176 et Cys149.

Le site actif est situé dans une grande poche présente entre les deux domaines principaux du monomère et la boucle S du monomère adjacent. Ce site renferme, entre autres, les résidus catalytiques Cys149 et His176, ainsi que des résidus impliqués dans la fixation des substrats (le D-G3P, le phosphate inorganique) et du produit (le 1,3dPG). La fixation de ces substrats implique la présence de deux sites de reconnaissance anionique. La détermination de la structure tridimensionnelle de la *GAPDH* de homard (Moras et al., 1975) a montré l'existence de ces deux sites anioniques, dont les positions sont occupées par des ions sulfates provenant du milieu de cristallisation. Dans le but de modéliser l'intermédiaire thiohémiacétal, Moras et al. (1975) ont émis l'hypothèse que ces ions sulfate occupaient les mêmes positions que le phosphate en C₃ du substrat et le phosphate inorganique, ces positions ont été notées respectivement Ps et Pi (figure II-8).

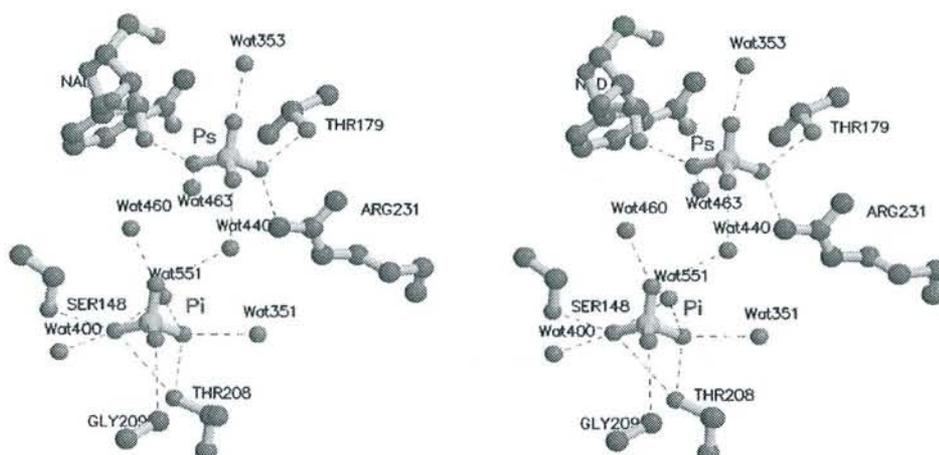


Figure II-8 : Vue stéréographique du site de reconnaissance anionique Pi et Ps de la *GAPDH* de *B. stearotherophilus* (Skarzynski et al., 1987).

II. 4. Mécanisme catalytique de la *GAPDH*

II. 4. 1. Introduction

Le mécanisme réactionnel de la *GAPDH* a été étudié par un grand nombre d'auteurs sur la base d'études cinétiques à l'état stationnaire et préstationnaire. Leurs études ont cependant mené à des conclusions différentes et controversées. Ainsi les études de Furfine & Velick (1965), sur la *GAPDH* isolée du muscle de lapin, ont conclu à un mécanisme

réactionnel d'association au hasard **Ter-Bi**, alors que Keleti (1965) a proposé pour la *GAPDH* de porc que l'association du *G3P* et NAD^+ était aléatoire. Fahien (1967) a mis en évidence un mécanisme ordonné avec fixation du NAD^+ , du *G3P*, de l'arsenate et ensuite d'une nouvelle molécule de NAD^+ .

Un peu plus tard, Orsi & Cleland (1972) conclurent au mécanisme réactionnel Ter-Bi représenté ci-après (figure II-9). Ce mécanisme a été conforté depuis par cette même équipe par des expériences d'effets isotopiques (Canellas & Cleland, 1991).

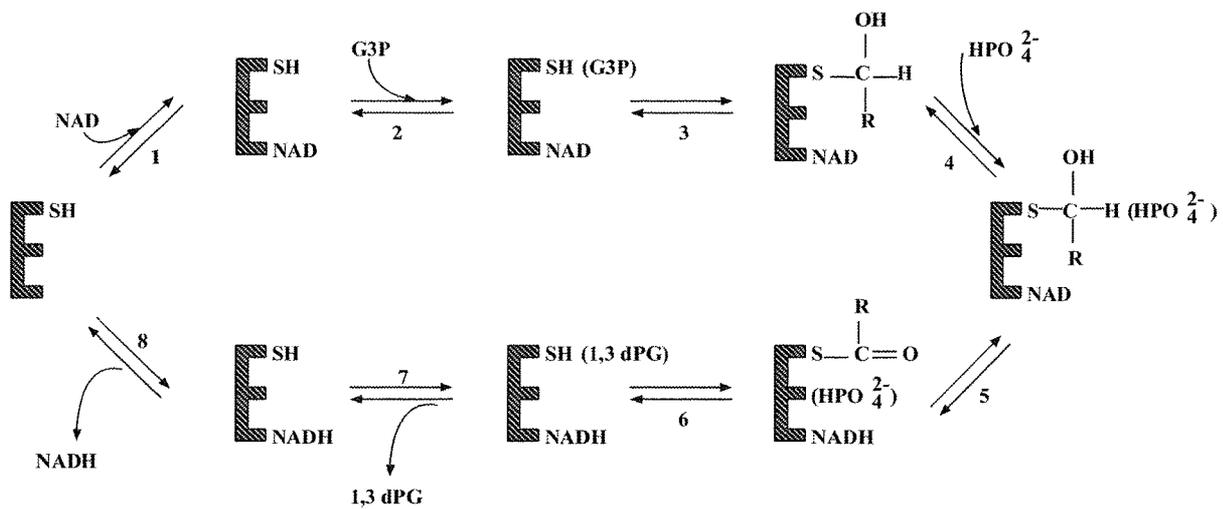


Figure II-9 : Schéma du mécanisme proposé par Orsi & Cleland (1972) (Ter-Bi)

Néanmoins, Liu & Huskey (1992) réfutent cette hypothèse et soutiennent celle proposée par Segal & Boyer (1953) qui se résume par un mécanisme **ping-pong** (double déplacement) (figure II-10), dans lequel l'holoenzyme et l'acylenzyme sont les formes les plus stables. Ce mécanisme avait été également conforté et affiné par des études cinétiques de Trentham et al. Duggleby & Dennis, 1974a ; Duggleby & Dennis, 1974b ; Harrigan & Trentham, 1974 ; Trentham, 1971a ; Trentham, 1971b. C'est ce mécanisme qui est le plus couramment accepté de nos jours.

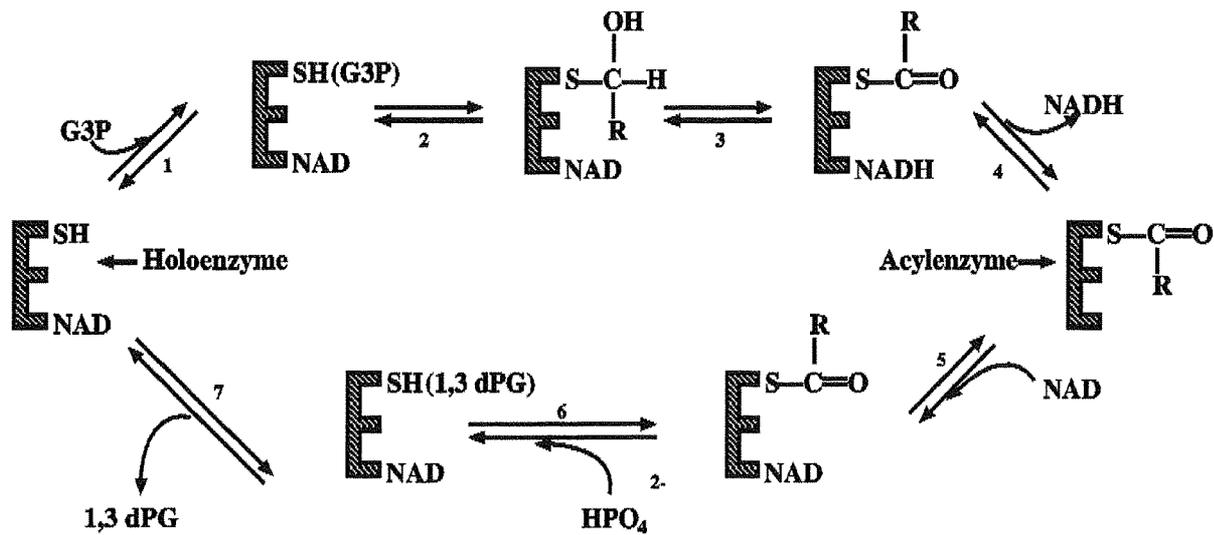


Figure II-10: Schéma du mécanisme proposé par Segal & Boyer (1953) (Ping-pong)

Les études cinétiques (Corbier *et al.*, 1994 ; Corbier *et al.*, 1990b ; Liu & Huskey, 1992 ; Trentham, 1971a), suggèrent que les étapes limitantes de la réaction pour les *GAPDH* d'origines diverses seraient :

- dans le sens de l'oxydation phosphorylante : la phosphorolyse à pH acide, et une étape associée au relargage du NADH à pH basique ;
- dans le sens de la déphosphorylation : le relargage du D-G3P à pH acide et un changement conformationnel lié à la fixation du NADH à pH basique.

II. 4. 2. Mécanisme détaillé

Le mécanisme détaillé ci-dessous est celui proposé initialement par Segal et Boyer (1953), puis approfondi par de nombreuses autres études.

II. 4. 2. a. Formation de l'intermédiaire thiohémiacétal

L'intermédiaire thiohémiacétal se forme par une attaque nucléophile du groupement thiolate de la Cys149 sur le carbone aldéhydique du G3P (sp²). L'attaque du groupement thiolate se fait préférentiellement en dehors du plan du carbone sp² pour réduire les interactions défavorables de type coulombienne entre l'oxygène et le soufre.

La nucléophilie de la Cys149 est augmentée par le biais d'une paire d'ions entre le thiol de la Cys149 et le groupement imidazole de l'His176 (Talfournier *et al.*, 1998). L'état de transition tétraédrique nécessaire pour la formation du thiohémiacétal est stabilisé par le

groupement imidazole et le groupement nicotinamide du NAD^+ . Toutefois, l'existence de cet intermédiaire n'a pas pu être prouvé expérimentalement du fait de son caractère instable.

Les étapes de formation de cet intermédiaire thiohémiacétal sont décrites dans les figures II-11 à II-13.

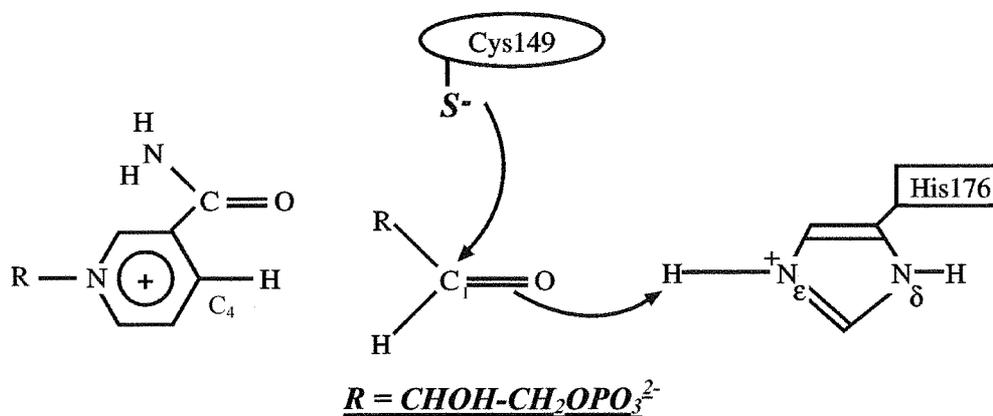


Figure II-11 : La Cys149, dont la réactivité est augmentée par le biais d'une paire d'ions avec l'His176 protonée, attaque le centre électrophile du G3P.

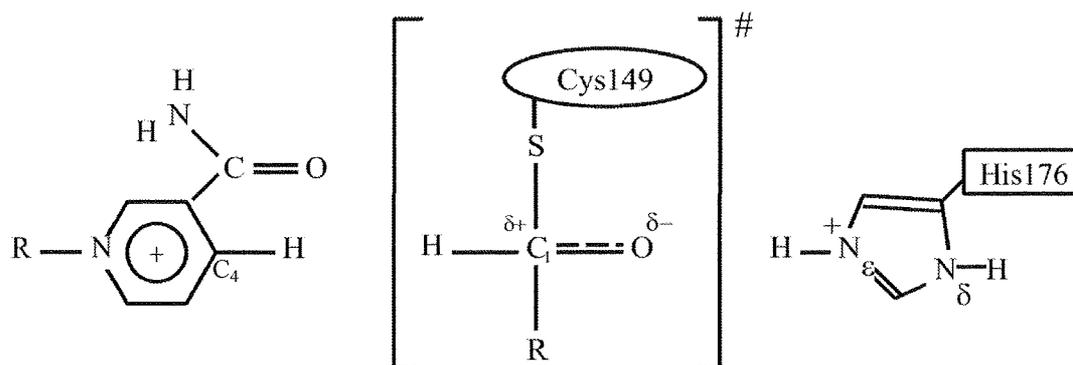


Figure II-12: Etape de transition pour la formation du thiohémiacétal

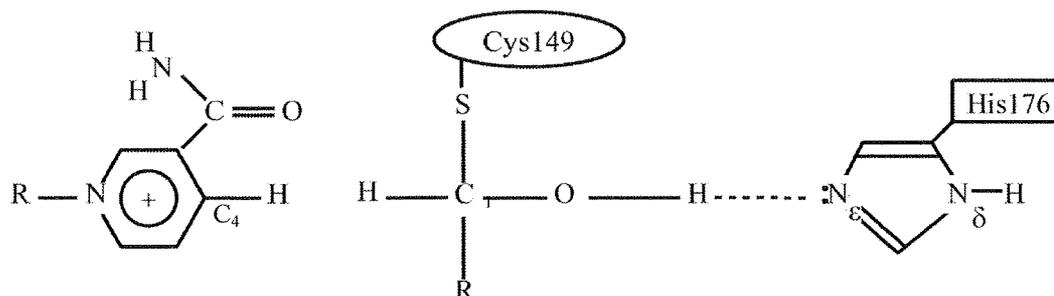


Figure II-13 : Stabilisation du thiohémiacétal par l'His176

II. 4. 2. b. Formation de l'acylenzyme

Cette étape conduit, via un transfert d'hydrure du C₁ de l'intermédiaire thiohémiacétal vers le carbone C₄ du nicotinamide, à la formation de l'intermédiaire thioacylenzyme et du cofacteur réduit. Le transfert d'hydrure pourrait être facilité par l'His176 jouant le rôle de base. L'acylenzyme est assez stable puisqu'il a pu être isolé à partir de l'enzyme de muscle de lapin (Bloch *et al.*, 1971). Cette stabilisation pourrait être due à la présence d'une liaison hydrogène entre l'oxygène en C₁ de l'acylenzyme et un groupement NH de l'imidazole de l'His176 protonée.

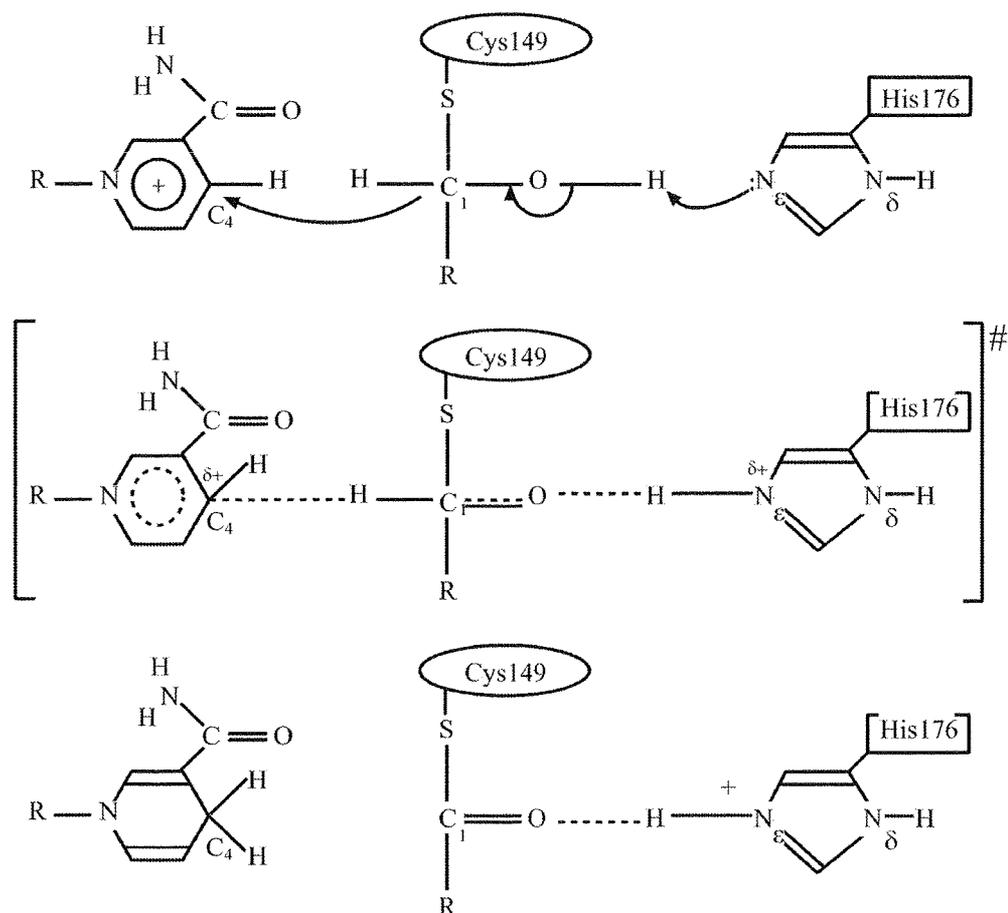


Figure II-14 : Formation de l'acylenzyme à partir du thiohémiacétal

Le cofacteur réduit se dissocie ensuite du complexe ternaire puis une nouvelle molécule de coenzyme oxydé vient alors s'y fixer (figure II-14). Cette étape de remplacement

de cofacteur est accompagnée d'un changement conformationnel important (Skarzynski & Wonacott, 1988).

II. 4. 2. c. Intermédiaire phosphorylé

Dans les conditions physiologiques, une molécule de phosphate inorganique, sous la forme d'un ion HPO_4^{2-} (Armstrong & Trentham, 1976), vient attaquer l'acylenzyme sur le carbone C_1 . Cette attaque nucléophile du phosphate inorganique sur le carbone plan de l'acylenzyme s'effectue de façon similaire à l'attaque du thiolate de la Cys149 sur le carbone plan de l'aldéhyde, et elle pourrait être facilitée par la présence de l'His176 protonée jouant le rôle d'acide. L'intermédiaire tétraédrique formé pourrait alors être stabilisé par une liaison hydrogène entre son OH en C_1 et l'imidazole non protoné de l'His176.

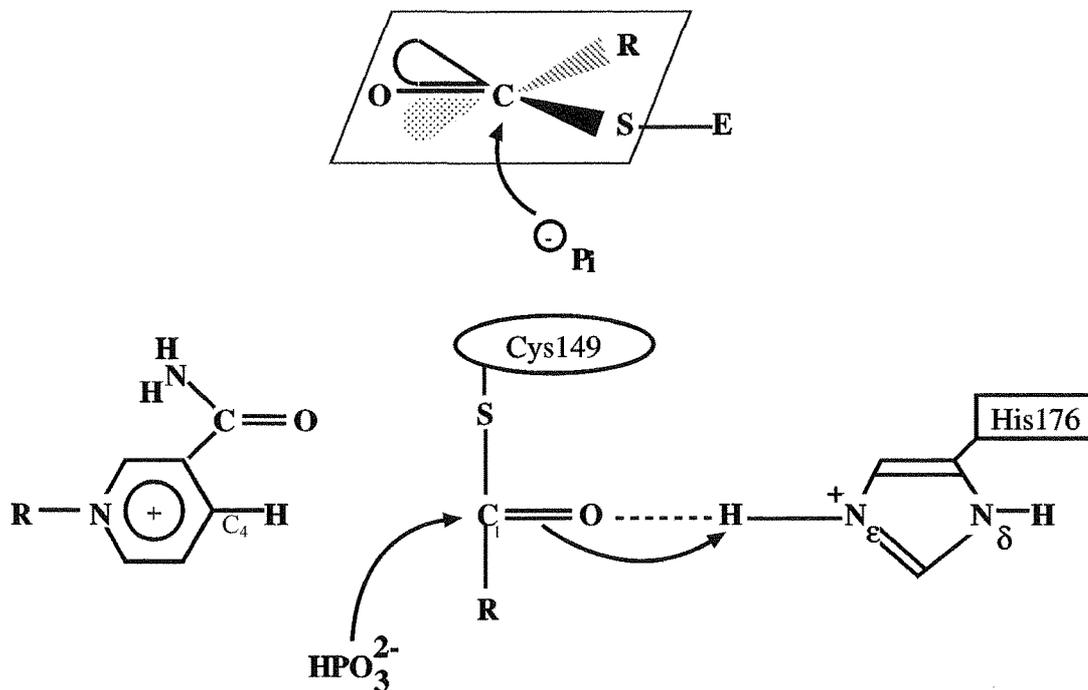


Figure II-15 : Attaque nucléophile du phosphate inorganique assisté par l'His176.

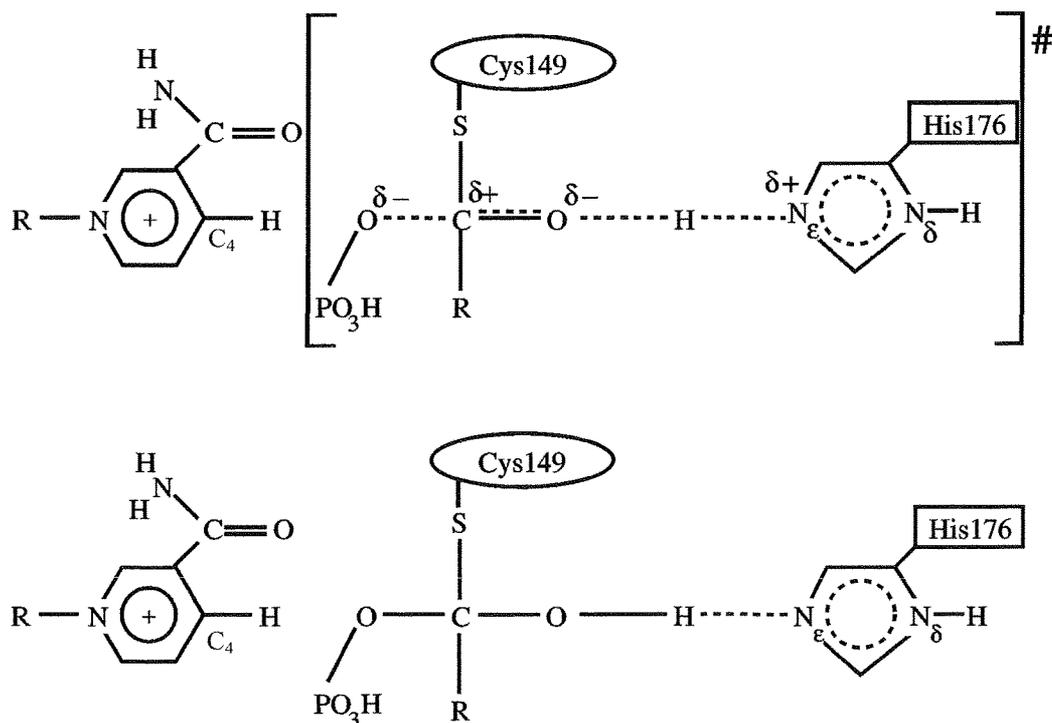


Figure II-16 : Etat de transition pour la production de l'intermédiaire tétraédrique phosphorylé

La vitesse de cette étape de phosphorylation est fortement accélérée par la présence du NAD^+ . Une explication possible serait une polarisation de la liaison C-S due à la proximité de l'atome de soufre de la Cys149 avec la charge positive en C₄ du nicotinamide, ce qui rendrait la liaison thioester moins stable par rapport à l'ester phosphorique (Biesecker *et al.*, 1977; Trentham, 1968).

Les figures II-15 et II-16 montrent les étapes de formation de l'intermédiaire phosphorylé.

II. 4. 2. d. Relargage du produit

Cette dernière étape est constituée par le relargage du produit (1,3-dPG) (figure II-17), qui serait accompagné du relargage d'un proton (Harrigan & Trentham, 1973), conduisant à la libération de l'enzyme sous sa forme active (holoenzyme) (figure II-18).

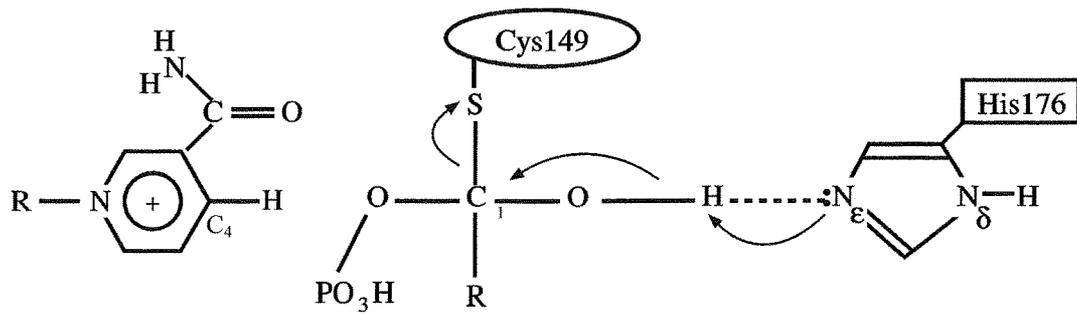


Figure II-17 : Le relargage du produit 1,3-dPG assisté par l'His176 jouant le rôle de base.

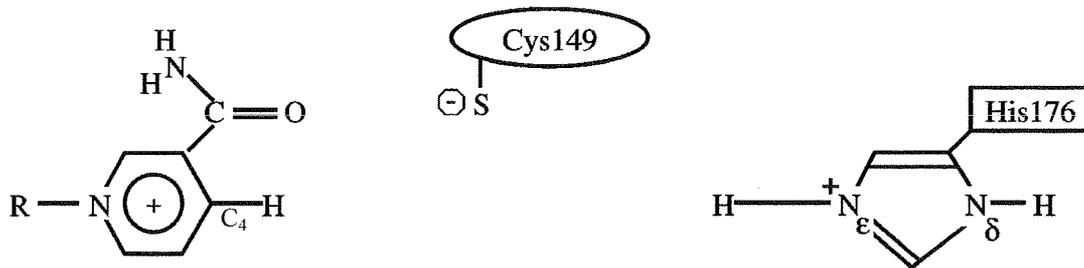


Figure II-18 : L'enzyme se retrouve sous la forme holoenzyme.

Chapitre III

SITES ANIONIQUES ET COMPLEXES TERNAIRES

Chapitre III : Sites anioniques et complexes ternaires de la GAPDH

III. 1. Description du site actif de la GAPDH

Le site actif est situé dans le fond d'une large poche formée par les domaines catalytiques et de fixation du cofacteur du monomère et la S-loop du monomère adjacent. Les composants principaux de ce site sont les deux résidus impliqués directement dans la catalyse : la Cys149 et l'His176 (Harrigan & Trentham, 1974 ; Moras et al., 1975; Trentham, 1971a), le groupement nicotinamide du NAD et les deux sites de reconnaissances anioniques qui fixent le phosphate du substrat et le phosphate inorganique lors de la réaction enzymatique.

III. 1. 1. Les résidus catalytiques : Cys149 et His176

Le résidu Cys149 est situé en C-terminal de l'hélice α_2 (résidus 148-164). La position de la chaîne latérale de la Cys149 est similaire dans toutes les structures de GAPDH résolues (Duée et al., 1996; Kim *et al.*, 1995; Korndörfer *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1993; Mercer *et al.*, 1976; Moras et al., 1975; Song *et al.*, 1999; Tanner *et al.*, 1996; Watson & Banaszak, 1964; Watson *et al.*, 1972), mis à part les GAPDH d'archaées. Ce résidu intervient dans la formation des intermédiaires covalents thiohémiacétal et thioacyle. Par contre, en ce qui concerne l'His176, plusieurs orientations sont présentes. Dans l'enzyme de homard (Moras et al., 1975), l'atome N_{δ1} de l'His176 forme des liaisons hydrogène asymétriques. Il établit une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle du résidu conservé Tyr311 dans deux sous-unités et de la Ser238 dans les deux autres sous-unités. Moras et al. (1975) ont suggéré que seul le premier dimère est actif puisque la liaison hydrogène de l'His176 avec la Tyr311 permet à ce premier résidu d'être mieux orienté pour arracher un proton à la Cys149 qui effectuerait, par la suite, une attaque nucléophile sur le substrat. Par contre, dans la structure de la GAPDH de *B. stearothermophilus* résolue à 1,8 Å (Skarzynski et al., 1987), cet atome N_{δ1} de l'His176 forme une liaison hydrogène avec l'oxygène du carbonyle de la Ser177 avec une distance moyenne entre N_{δ1}-His176 et O-Ser177 de 2,63 Å. Cette liaison est supposée

avoir pour effet de fixer le plan du cycle imidazole de l'histidine et de déterminer l'orientation de ce dernier. L'autre azote, $N_{\epsilon 2}$, de cette chaîne latérale, est situé à 3,6 Å de l'atome de soufre de la Cys149. Il peut jouer le rôle d'accepteur d'électron. A l'exception des GAPDH d'archaes et de la GAPDH de homard, toutes les autres GAPDH dont la structure a été résolue ont une orientation pour l'His176 similaire à celle observée dans la structure de l'enzyme de *B. stearothermophilus*.

Dans la structure de la GAPDH de *Sulfolobus solfataricus*, la première enzyme d'archaebactérie dont la structure tridimensionnelle a été résolue (Isupov et al., 1999), la Cys139 est dans la même position topologique que son équivalent, la Cys149, du site actif de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. Toutefois, les orientations de leurs chaînes latérales sont différentes. En effet pour la Cys139 de la GAPDH de *S solfataricus*, $\chi_1 = -45^\circ$ alors que pour la Cys149 de la GAPDH de *B. stearothermophilus* $\chi_1 = 50^\circ$. De plus, le résidu His176 situé sur le brin β_1 du domaine catalytique de la GAPDH de *B. stearothermophilus* n'est pas conservé dans les GAPDH d'archaes. Par contre, l'His219, conservée dans ces enzymes, située au niveau du brin β_4 du domaine catalytique semble jouer un rôle équivalent à celui de l'His176. En effet, la distance entre le C_α de la Cys149 et l'atome $N_{\epsilon 2}$ de l'His176 dans la GAPDH de *B. stearothermophilus* (6,2 Å) est comparable à celle observée entre le C_α de la Cys139 et l'atome $N_{\epsilon 2}$ de l'His219 dans la GAPDH de *S. solfataricus* (5,9 Å) (Isupov et al., 1999).

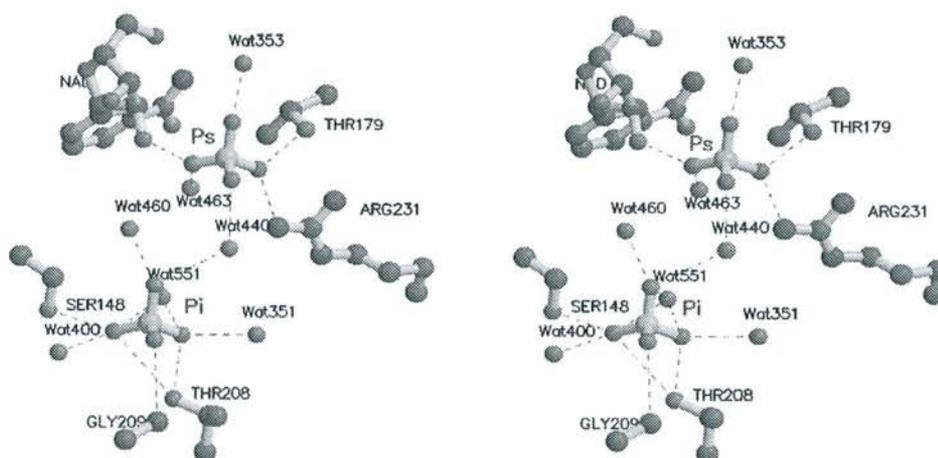


Figure III-1 : Vue stéréoscopique du site actif de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Skarzynski et al., 1987)

III. 1. 2. Les sites anioniques

La structure cristallographique de la GAPDH de homard (Moras et al., 1975) a permis de mettre en évidence deux pics de densité électronique non protéiques correspondant à deux ions sulfates provenant de la liqueur mère de cristallisation. Les deux sites de reconnaissance anioniques, ont été attribués, pour l'un, à la position du phosphate en C₃ du substrat (site *Ps*) et pour l'autre, à la position du phosphate inorganique (site *Pi*) durant la réaction catalytique. Cette assignation du site du phosphate inorganique (*Pi*) et du site du phosphate du substrat (*Ps*) a été proposée sur la base de la modélisation de l'intermédiaire thiohémiacétal dans le site actif (Moras et al., 1975).

a) Site *Ps*

Dans la structure de l'holoenzyme de *B. stearothermophilus* (Skarzynski et al., 1987), le site *Ps* est totalement occupé par un ion sulfate qui forme des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales conservées de l'Arg231 et la Thr179 (figure III-2), elles-mêmes liées entre elles par une liaison hydrogène. L'ion sulfate forme aussi une liaison hydrogène avec le groupement 2'-hydroxyle du ribose du nicotinamide du NAD (O2'N). La contribution de la partie ribose du nicotinamide semble essentielle à la formation du site *Ps*. En effet, la densité électronique du sulfate de ce site est plus faible dans la forme apo que dans la forme holo de l'enzyme de *B. stearothermophilus* (Skarzynski et al., 1987). La structure du site *Ps* est quasi équivalente dans toutes les structures de GAPDH, exceptées les GAPDH d'archaées.

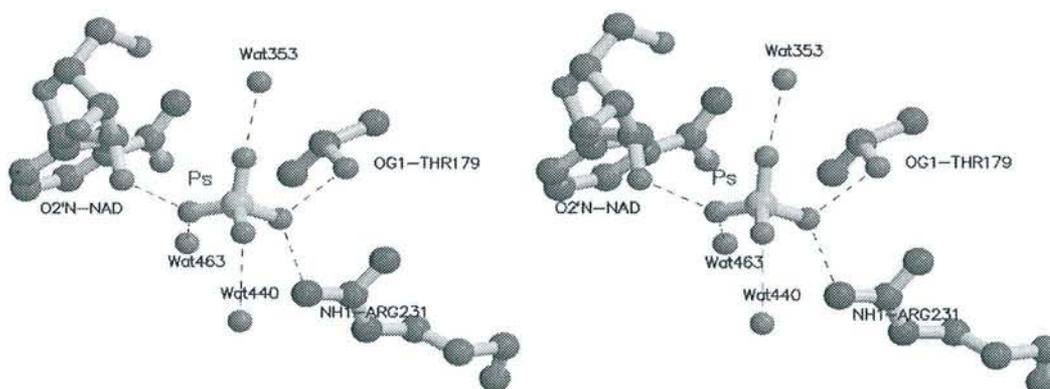


Figure III-2 : Vue stéréoscopique du site de reconnaissance anionique *Ps* de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Skarzynski et al., 1987).

Seule l'Arg231 présente un changement conformationnel au niveau de sa chaîne latérale, dans deux structures de GAPDH résolues : *E. coli* et *T. cruzi* (Duée et al., 1996; Souza et al., 1998). Ces deux enzymes cristallisent en absence de sulfate et de phosphate et présentent des sites Pi et Ps exempts de tout anion. Dans la structure de la GAPDH d'*E. coli* (Duée et al., 1996) deux positions de la chaîne latérale sont mises en évidence : l'une correspond à la position trouvée dans la GAPDH de *B. stearothermophilus* (liaison hydrogène avec l'atome O_{γ1}-Thr179), l'autre position permet la formation d'un pont salin avec l'Asp192 et occupe en partie le volume occupé par la chaîne latérale de l'Arg195 de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (dans la GAPDH d'*E. coli* le résidu 195 est une Gly). Dans l'holoenzyme de *T. cruzi* (Souza et al., 1998) seule la conformation où l'Arg249 (équivalente à l'Arg231 de la GAPDH de *B. stearothermophilus*) forme un pont salin avec l'Asp210 (équivalente à l'Asp192 la GAPDH de *B. stearothermophilus*) est présente. Le changement conformationnel de la chaîne latérale de cette Arginine a été interprété comme étant une conformation requise pour positionner le substrat dans le site actif pour la réaction catalytique, ainsi que pour le relargage du produit à la fin de la réaction.

Dans la structure de la GAPDH de *S. solfataricus*, le site Ps est formé par les groupements guanidinium de l'Arg166 et de l'Arg167. Ces résidus sont conservés dans toutes les GAPDH d'archaées. Toutefois, la position de ce site dans le domaine catalytique n'est pas similaire à celle rencontrée dans les autres GAPDH.

b) Site Pi

Dans la structure de l'holoenzyme de *B. stearothermophilus*, le site Pi est partiellement occupé par un ion sulfate. Ce dernier établit des liaisons hydrogène avec les résidus conservés Ser148 et Thr208 et l'azote de la chaîne principale de Gly209 (figure III-3). Il forme aussi des liaisons hydrogène indirectes, via deux molécules d'eau, avec l'Arg195, permettant ainsi une interaction avec la charge positive localisée sur le groupement guanidinium de cette arginine. Ce résidu est présent uniquement dans les GAPDH isolées des organismes thermophiles. Skarzynski et al. (1987) ont émis l'hypothèse que le résidu Arg194 invariant dans les GAPDH mésophiles pourrait être l'équivalent structural de l'Arg195, à cause de la délétion au niveau de la position 189 dans les GAPDH thermophiles. Cette hypothèse a été dernièrement réfutée après la détermination de la structure de la GAPDH de *E. coli* à haute résolution (Duée et al., 1996). Une superposition complète de la chaîne latérale de l'Arg194 des GAPDH d'*E. coli* et *B. stearothermophilus* est observée, excluant toute possibilité de contribution de l'Arg194 à la formation du site Pi dans les GAPDH mésophiles.

L'interaction de l'ion sulfate avec les résidus Thr208 et Gly209 montre que la boucle β_2 - α_2 (Thr207-Ala210) est impliquée dans la formation du site Pi. Cependant, la conformation de cette boucle dans les GAPDH de *T. martima*, *L. mexicana* et *P. versicolor* carboxyméthylée (Kim et al., 1995; Korndörfer et al., 1995; Song et al., 1999) est différente de celle observé dans les autres GAPDH (Duée et al., 1996; Lin et al., 1993; Mercer et al., 1976; Song *et al.*, 1998; Tanner et al., 1996; Watson & Banaszak, 1964; Watson et al., 1972). Cette boucle, hautement conservée dans toutes les GAPDH, est déplacée dans ces trois enzymes, vers le centre du site actif. Par conséquent, une nouvelle position est affectée à l'anion fixé dans le site Pi de ces structures. Les distances entre les sites Pi et Ps dans l'enzyme de *B. stearothermophilus* est de 7 Å, alors que dans les enzymes de *T. martima*, *L. mexicana* et *P. versicolor* (carboxyméthylée), ces distances sont respectivement de 6,1 Å, 6,5 Å et 7,1 Å. Cette nouvelle position est supposée être la "vraie" position d'où s'effectue l'attaque du phosphate inorganique durant la réaction de phosphorolyse (Kim et al., 1995).

Dans la structure de la GAPDH de *S. solfataricus*, le site Pi est constitué par le groupement hydroxyle de Ser138 (équivalente à Ser148 dans la GAPDH de *B. stearothermophilus*), les atomes d'azote de la chaîne principale et de la chaîne latérale de l'Asn148, le groupement guanidinium de l'Arg166 et les groupements imidazole de l'His192 et de l'His193. Tous ces résidus sont conservés dans les GAPDH d'archae. Isupov et al. (1999) suggèrent que les deux résidus, His192 et His193, sont équivalents aux résidus Thr208 et Gly209 qui sont impliqués dans le site Pi de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. Le site Pi est déplacé, par rapport à celui de l'enzyme de *B. stearothermophilus*, vers la cystéine du site actif. La distance entre les sites Pi et Ps dans l'enzyme de *B. stearothermophilus* et dans l'enzyme de *S. solfataricus* diffère de 0,8 Å.

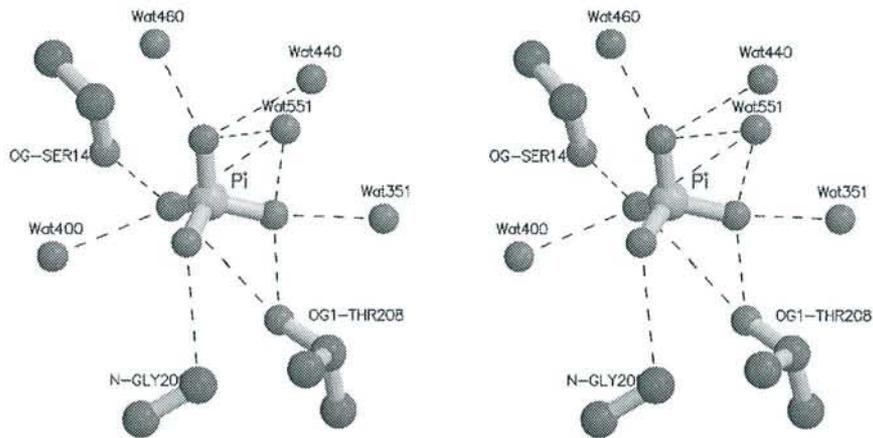


Figure III-3 : Vue stéréoscopique du site de reconnaissance anionique Pi de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Skarzynski et al., 1987)

III. 2. Etude bibliographique des complexes ternaires de la GAPDH

III. 2. 1. Structures de complexes ternaires étudiés (GAPDH + NAD⁺ + inhibiteur)

La première structure de complexe ternaire de GAPDH a été réalisée par Olsen et al. (1976). Les cristaux de la GAPDH de homard, obtenus en présence du sulfate d'ammonium, ont été dialysés contre une solution de citrate de sodium. Ceci a permis de remplacer les deux ions sulfate du site actif par un ion citrate, dont les deux groupements carboxyle terminaux (en C₅ et C₁) sont respectivement liés aux sites Pi et Ps (figure III-4). D'une part, cette étude a permis de confirmer que les deux pics observés dans le site actif de l'holoenzyme de homard (Moras et al., 1975) sont bien des pics non protéiques et représentent les sites de fixation du phosphate du substrat et du phosphate inorganique durant la réaction catalytique. D'autre part, il a été possible de montrer, par cette structure, que le site actif était symétrique dans les quatre sous-unités de l'enzyme de homard, réfutant l'hypothèse de l'asymétrie de ce site proposée par Moras et al. (1975).

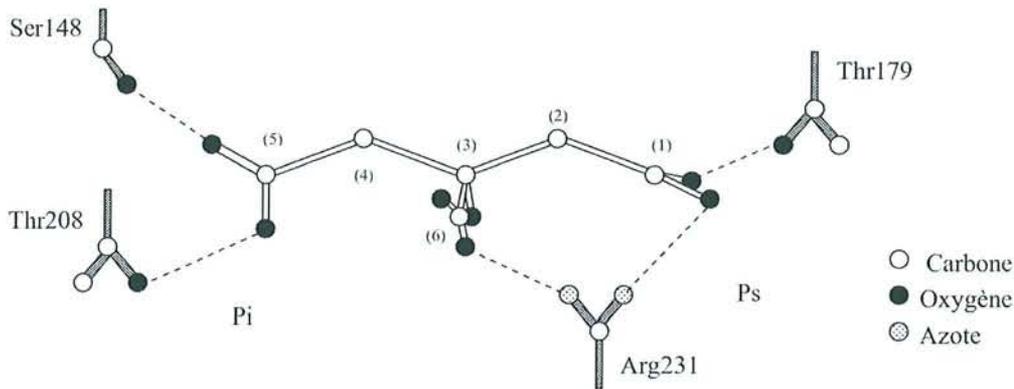


Figure III-4: Représentation schématique de la molécule du citrate dans le site actif (d'après Garavito et al., 1977a).

L'agent alkylant 3,3,3-trifluoroacétone (TFA) est considéré comme un analogue structural de l'intermédiaire acyloenzyme (figure III-5). La GAPDH du muscle du lapin a été cocristallisée avec l'inhibiteur TFA, dans la même condition que la forme holoenzyme (en utilisant le sulfate d'ammonium comme agent précipitant) (Garavito *et al.*, 1977a). Cette étude a montré qu'il existe deux conformations distinctes pour le groupement TFA (figure III-6). Dans les sous-unités O et Q, le TFA adopte une conformation étendue vers le site de fixation anionique du substrat (Ps). Dans les sous-unités P et R, le groupement CF_3 est plus proche du site Pi, occupé par un ion sulfate. L'ion sulfate, identifié dans le site Ps de la structure de l'holoenzyme, s'est dissocié en présence de l'inhibiteur TFA. Les sites Ps sont ainsi exempts de tout anion sulfate dans les quatre sous-unités de ce complexe ternaire.

Le TFA est plus court que le substrat naturel G3P. Le groupement CF_3 ne pourrait donc pas se lier de la même manière que le phosphate du substrat. Dans le dimère P-R, la partie nicotinamide du cofacteur NAD^+ s'est déplacée par rapport à la Cys149. Finalement, l'His176 dans le dimère O-Q serait éloignée de l'inhibiteur, tandis que dans le dimère P-R, elle serait plus proche. Ces résultats sont en accord avec les études antérieures, utilisant le groupement CF_3 comme sonde pour les études de RMN à ^{19}F (Bode *et al.*, 1975a; Bode *et al.*, 1975b). D'après ces études de RMN, Bode et al. (1975b) avaient conclu que le complexe ternaire GAPDH- NAD^+ -TFA était asymétrique. Cette asymétrie serait responsable des conformations adoptées par l'analogue TFA dans le site actif.

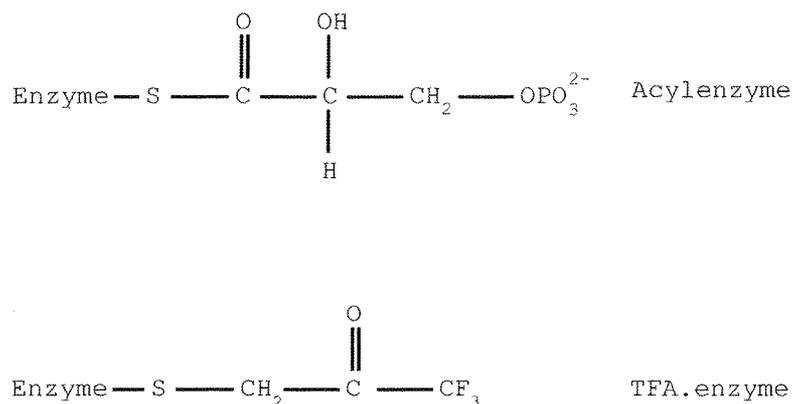


Figure III-5 : Structure schématique de l'acylenzyme et du complexe obtenu après réaction entre l'enzyme et la TFA.

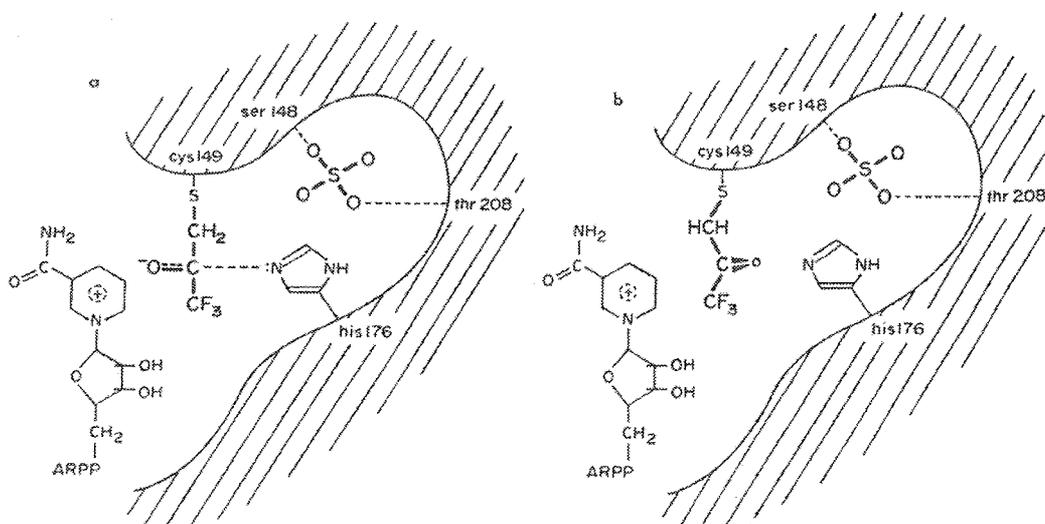


Figure III-6 : Représentation schématique montrant la conformation du complexe TFA-enzyme (a) dans les sous-unités O/Q et (b) dans les sous-unités P/R (d'après (Garavito et al., 1977a).

Le β -(2-furyl)acryloyl-phosphate (FAP) acyle la GAPDH de manière analogue à la réaction inverse de cette enzyme avec son produit, le 1,3dPG (figure III-7). Le FAP a été suggéré comme candidat, pour obtenir un analogue de l'acylenzyme (Schmidt *et al.*, 1978; Vas *et al.*, 1979). Cependant, même si ce complexe obtenu possède plusieurs propriétés de l'acylenzyme naturel, ce composé présente avec l'enzyme, un phénomène de réactivité de demi-site, qui n'est pas observé dans les conditions physiologiques avec le substrat naturel. La

conformation plane de tous les atomes de carbone de la chaîne et le manque de l'hydroxyle en C₂ montre que la fixation ne peut pas être parfaitement semblable à celle du substrat naturel.

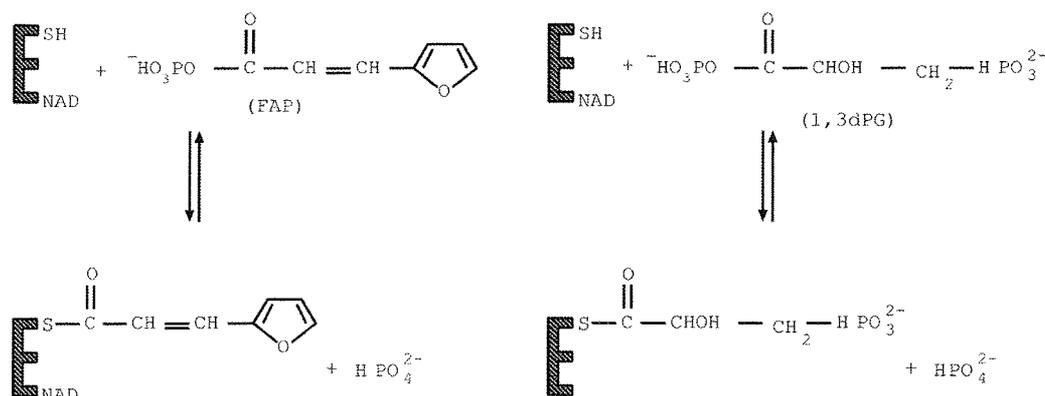


Figure III-7 : Comparaison schématique des réactions de l'holoenzyme avec le 1,3dPG et le FAP.

Le glycidol-3-phosphate (figure III-8) a été utilisé comme marqueur d'affinité pour la triose phosphate isomérase, pour laquelle le G3P est aussi substrat (Rose & O'Connell, 1969; Waley *et al.*, 1970). Il a aussi été utilisé pour l'étude des effets du phosphate en C₃ sur l'énergie de fixation dans la GAPDH (Byers, 1977). Cet inhibiteur entre en compétition avec le substrat, rendant ainsi inactifs tous les sites catalytiques de l'enzyme (McCaul & Byers, 1976).

La structure d'un complexe ternaire avec le glycidol-3-phosphate a été réalisée avec la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Moody, 1984). Cette structure montre que l'attaque de la Cys149 sur l'inhibiteur glycidol-3-phosphate se fait sur le carbone C₁, ouvrant ainsi le cycle époxyde. Le produit cystéinyle-S-propan-2ol-3-phosphate a été utilisé pour modéliser l'intermédiaire thiohémiacétal (figure III-9). Dans la structure du complexe ternaire, le phosphate en C₃ de l'inhibiteur glycidol-3-phosphate est fixé dans le site Pi, et forme des liaisons hydrogène avec la thréonine 150 et la sérine 148. Il établit aussi des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau, lesquelles interagissent elles-mêmes par des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales des arginines 195 et 231. Le site Ps est occupé par un ion sulfate. Il forme des liaisons hydrogène avec le groupement guanidinium de l'arginine 231, avec l'oxygène de la chaîne latérale de la thréonine 179 et avec l'oxygène du ribose du cofacteur NAD⁺.

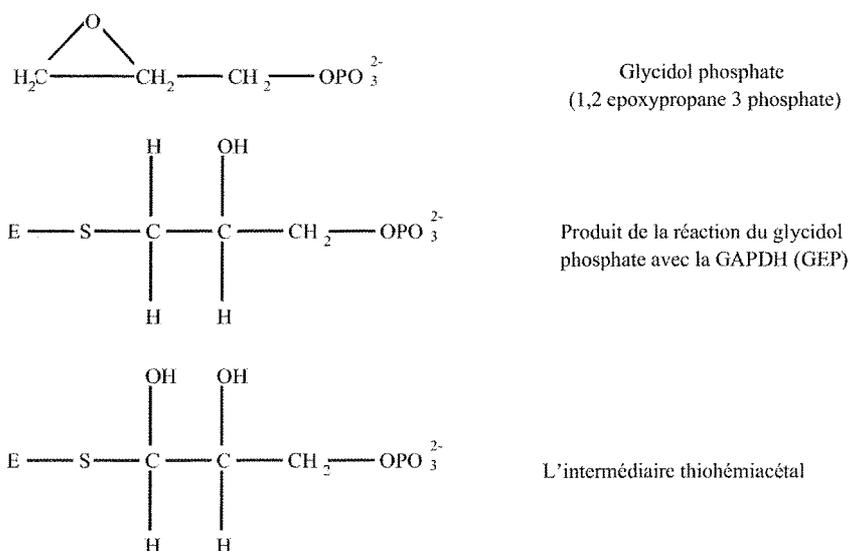


Figure III-8 : Représentation schématique des intermédiaires glycido-3-phosphate-enzyme et le thiohémicétal-enzyme

Partant de ces éléments, Moody (1984) a proposé que le processus enzymatique se déroule de la façon suivante : le phosphate en C₃ du G3P se fixerait d'abord dans le site Pi lors de la réaction d'oxydoréduction, puis migrerait vers le site Ps suite au changement conformationnel induit par le relargage du NADH et à l'entrée d'une nouvelle molécule de cofacteur oxydé. Ceci permettrait alors au phosphate inorganique de venir se positionner dans le site Pi, à partir duquel il aurait une géométrie appropriée pour l'attaque nucléophile ultérieure sur l'acylenzyme.

Ce modèle semble être partiellement conforté par des expériences de mutagenèse dirigée (Corbier et al., 1994), montrant que toute mutation d'un résidu du site Pi entraîne un ralentissement de l'étape d'oxydoréduction.

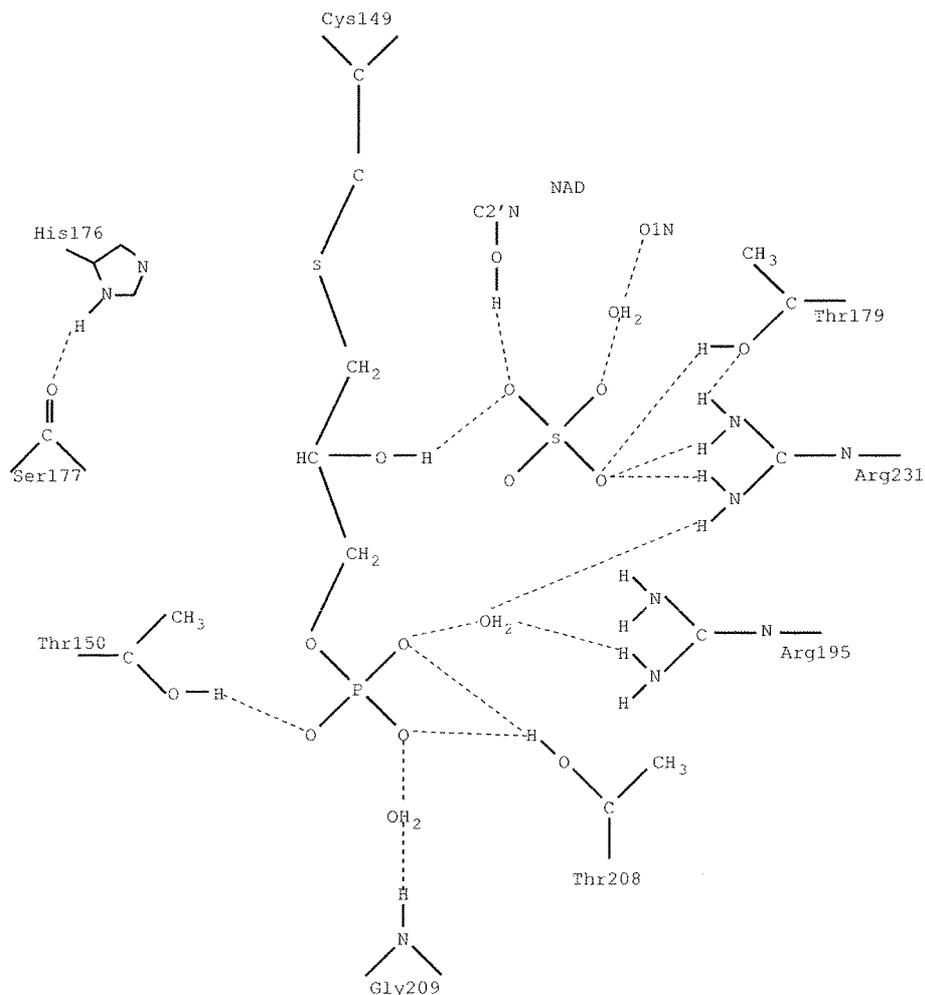


Figure III-9 : Représentation des interactions de l'inhibiteur glycidol-3-phosphate avec le site actif de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (d'après Moody, 1984).

Le Pentalenolactone est un antibiotique qui a pour effet de bloquer la glycolyse, dans différents organismes, par inhibition sélective de la GAPDH. Cet inhibiteur a été utilisé pour l'alkylation du site actif de la GAPDH du muscle du lapin (Cane & Sohng, 1994). L'étude RMN de ce complexe ternaire a montré que le pentalenolactone se lie de manière covalente à la Cys149. Cane et Sohng (1994) suggèrent que l'attaque du groupement sulfhydryl de la Cys149 sur la partie époxyde de l'inhibiteur provoque l'ouverture de ce cycle et la génération d'un produit covalent (figure III-10). De plus, l'oxygène du carbonyle de l'inhibiteur est bien placé pour occuper le site normalement occupé par le groupement hydroxyle en C₂ du G3P. Cependant, le reste des chaînes carbocycliques occuperait des sites qui ne sont pas utilisés par

le substrat naturel, et situés loin du ribose adjacent au nicotinamide du cofacteur. Même si la taille de cet inhibiteur (6,67 Å) est comparable à celle du substrat du G3P (6,37 Å), l'architecture de ces deux molécules est très différente.

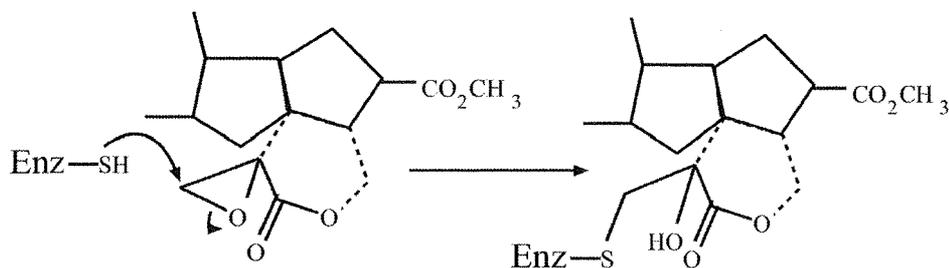


Figure III-10 : Mécanisme proposé pour l'inactivation de la GAPDH par la Pentalenolactone. Réaction de l'époxyde avec la Cys149 (d'après Cane & Sohng, 1994).

La structure de la GAPDH de *Palinurus versicolor* dont la Cys149 a été carboxyméthylée, a été récemment résolue (Song et al., 1999). Cette structure présente un changement conformationnel appréciable au niveau de la région contenant les résidus 208-222, par rapport à la structure de l'holoenzyme (Lin et al., 1993). Cette région qui forme le site Pi s'est déplacée vers le centre du site actif d'environ 2,5 Å. L'analyse de la structure montre que le groupement carboxyméthyle est lié de manière covalente à la Cys149 et qu'il est orienté vers le site Ps. Song et al. (1999) ont donc conclu que le site Ps était bien le site de fixation du phosphate du substrat G3P durant l'étape d'oxydoréduction. Cette structure leur a permis de modéliser l'intermédiaire thioester avec le groupement hydroxyle en C₂ formant une liaison hydrogène avec l'azote de la chaîne principale du résidu catalytique Cys149. L'hydroxyle en C₁ interagit par une liaison hydrogène avec N_ε-His176. L'hydrogène lié à C₁ pointe vers le nicotinamide du NAD, et est ainsi dans une position favorable pour le transfert d'hydrure. Le groupement phosphate en C3 est localisé près de la position du sulfate dans le site Ps. Il est stabilisé par des liaisons hydrogène avec Arg231, Thr179 et les atomes N7N et O2'N du cofacteur NAD.

III. 2. 2. Modèles structuraux de mécanisme catalytique : contribution respective des sites Pi et Ps

En l'absence d'une structure cristalline du complexe ternaire de l'enzyme de la GAPDH avec le substrat physiologique G3P, plusieurs hypothèses sur le mécanisme

catalytique ont été proposées, sur la base des études de modélisation des intermédiaires réactionnels dans les sites actifs des structures précédemment résolues. Actuellement, il existe trois modèles principaux pour expliquer le mécanisme catalytique et la contribution respective des sites Pi et Ps. :

1. *Modèle proposé par Moras et al. (1975)* : ce modèle a été proposé sur la base de la modélisation de l'intermédiaire thiohémiacétal dans la structure holo de l'enzyme de homard (figure III-11). Dans ce modèle, les auteurs supposent que, dans un premier temps, l'His176, qui forme une liaison hydrogène avec la Tyr311, pourrait déprotonner la Cys149 (figure III-12.a). Le substrat serait orienté dans le site actif, par l'interaction du phosphate en C₃ avec le site Ps, ainsi que par une liaison hydrogène ou une interaction ionique entre l'oxygène en C₁ et le groupement N_{ε2} de l'His176 d'une part, et entre le groupement hydroxyle en C₂ et la Ser148 d'autre part. Le substrat serait ensuite attaqué par l'atome de soufre de la Cys149, chargé négativement (figure III-12.b), produisant ainsi l'intermédiaire tétraédrique thiohémiacétal (figure III-12.c). L'oxygène du carbonyle en C₁ dévierait vers l'azote N_{ε2} de l'His176, positionnant ainsi correctement le carbone C₁ pour le transfert d'hydrure avec le nicotinamide. Dans la figure III-12.d sont représentés l'intermédiaire thioacylenzyme et le coenzyme réduit. L'étape suivante de la réaction catalytique est l'étape de la phosphorylation. Le substrat pourrait contribuer, par le biais de son groupement OH sur l'atome C₂, à la formation du site Pi. De plus, grâce aux autres ligands, Ser148 et Thr208, le phosphate inorganique tétraédrique pourrait être orienté convenablement pour l'attaque en C₁ du substrat depuis le site Pi. Le produit 1,3-diphosphoglycérate est ensuite libéré et l'holoenzyme est régénérée.

2. *Modèle proposé par l'équipe de Wonacott (Moody, 1984; Skarzynski et al., 1987)* : En tenant compte de la structure de la GAPDH de *B. stearothermophilus* déterminée à haute résolution (1,8 Å), Skarzynski et al. (1987) ont trouvé des différences au niveau du site actif par rapport à la structure de l'enzyme de homard (Moras et al., 1975). En effet, après la correction de l'orientation de la chaîne latérale de l'His176, ils présument qu'il n'est plus possible de construire un modèle raisonnable du thiohémiacétal avec son groupement phosphate dans le site désigné Ps. En se basant sur l'étude structurale du complexe ternaire de l'holoenzyme inhibée par le glycidol-3-phosphate, ils estiment que le phosphate en C₃ du substrat G3P se fixerait dans un premier temps dans le site Pi, puis après la réaction d'oxydoréduction et l'étape de remplacement du cofacteur, que le phosphate en C₃ du substrat migrerait du site Pi au site Ps, permettant au phosphate inorganique de venir se positionner dans le site Pi. Le phosphate inorganique attaquerait le carbone C₁ de l'acylenzyme, à partir du site Pi durant l'étape de phosphorylation.

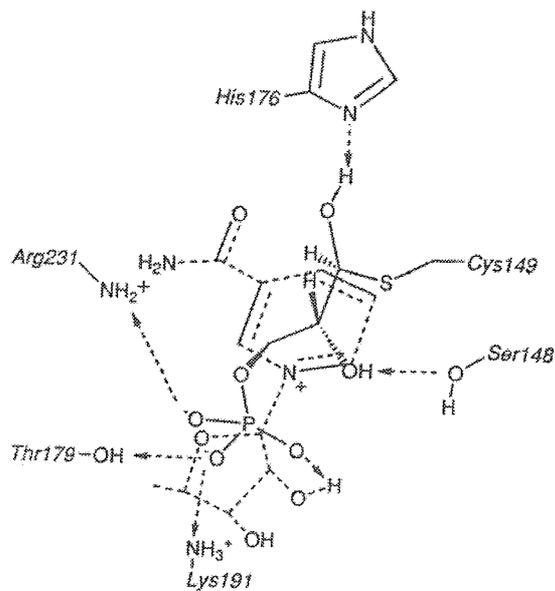


Figure III-11 : le modèle du site actif pour la GAPDH, illustrant l'intermédiaire thiohémiacétal et présentant les liaisons hydrogènes et les interactions ioniques, proposé par Moras et al. (1975), avec les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés et le cofacteur NAD^+ .

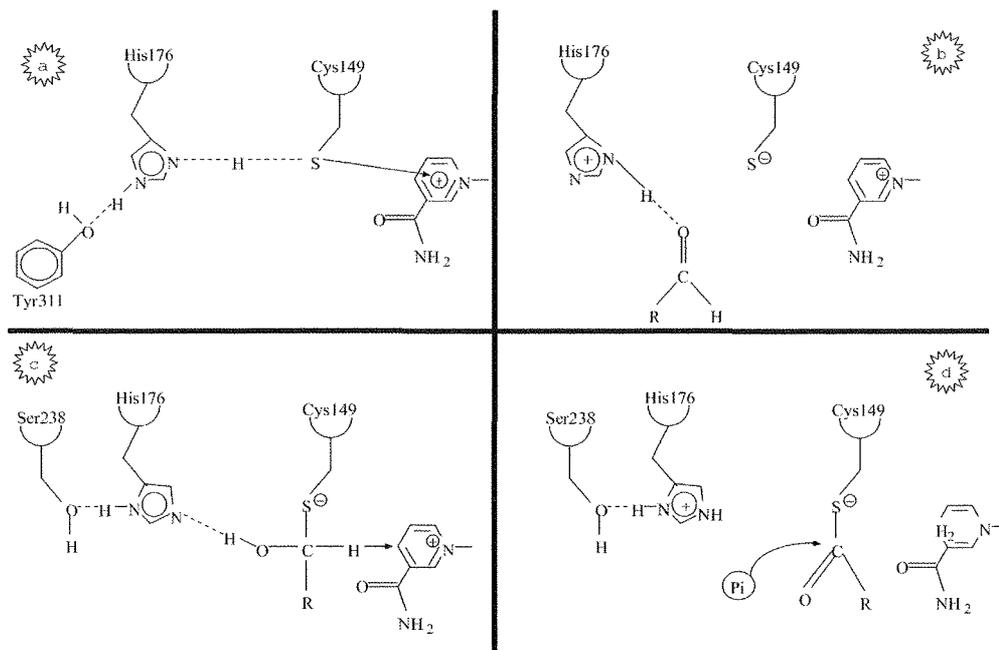


Figure III-12 : Les étapes proposées par Moras et al. (1975) pour la formation de l'intermédiaire thioester durant l'étape d'oxydoréduction.

3. *Modèle proposé par Kim et al. (1995)* : ce modèle est basé sur les structures des GAPDH de *Leishmania mexicana* et *Thermotoga maritima* (Kim et al., 1995; Korndörfer et al., 1995), dans lesquelles un changement conformationnel de la boucle 205 à 210 (dans la numérotation de l'enzyme de *B. stearothermophilus*) a été observé. Par conséquent, cette nouvelle position, affectée au phosphate inorganique, serait la "vraie" position d'où s'effectuerait l'attaque du phosphate inorganique durant l'étape de la phosphorylation.

La modélisation de l'intermédiaire thiohémiacétal a permis aux auteurs de favoriser l'hypothèse selon laquelle l'étape d'oxydation se fait avec le phosphate en C₃ du substrat lié au site Ps. Cependant, dans ce modèle, l'attaque du phosphate inorganique ne serait possible qu'à partir du nouveau site Pi, qui est plus proche de la Cys149, ainsi que du C₁ de l'intermédiaire acylenzyme.

Ce dernier modèle semble en accord avec les interprétations basées sur la structure de la GAPDH carboxyméthylée de *Palinurus versicolor* (Song et al., 1999) ou de la GAPDH d'*E. coli* (Duée et al., 1996).

III. 3. Objectifs

Le but de ces études est de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de la GAPDH. Les études antérieures ont permis de proposer des modèles chimiquement et structuralement plausibles sur la base des informations structurales de l'holoenzyme. Il n'y a, cependant, aucune évidence directe pour ces propositions. Afin de vérifier ces modèles hypothétiques, il semble essentiel de disposer d'évidences structurales directes, en étudiant le site actif en présence de son substrat physiologique. La validité des modèles pour la réaction sera examinée à la lumière de ces informations.

Seule une étude structurale du complexe ternaire de type GAPDH/NAD⁺/G3P et 1,3dPG permettrait de lever cette ambiguïté. Cependant un tel complexe est actif. La détermination cristallographique de sa structure est difficilement envisageable. Ce problème pourrait être contourné de 3 façons différentes :

- l'une consiste à travailler avec une enzyme inactive (en mutant un résidu essentiel de la catalyse, la cystéine 149 par exemple).
- l'autre consiste à utiliser l'enzyme de type sauvage, et à y ajouter des pseudo-substrats inhibiteurs de la réaction catalytique.

- une troisième consiste à cocrystalliser l'enzyme sauvage avec un pseudo-substrat photosensible permettant ainsi de faire des mesures en temps résolu par la méthode de Laue.

Nous avons privilégié la première voie, en travaillant avec deux mutants de l'enzyme de type sauvage en présence du substrat physiologique *G3P*.

La nature du nucléophile essentiel impliqué dans la catalyse enzymatique a été modifiée par ingénierie protéique. Pour cela, la cystéine 149 a été remplacée par un résidu non nucléophile, en l'occurrence une alanine, et par un résidu moins nucléophile qu'une cystéine, une sérine. Le mutant (C149A) ainsi obtenu est inactif et le mutant (C149S) n'est que très faiblement actif. La GAPDH de *B. stearothermophilus* a été choisie comme modèle d'étude structurale, parce que cette enzyme est fortement exprimée dans *E. coli* et sa structure tridimensionnelle est connue à haute résolution (Skarzynski et al., 1987).

Le travail, qui fait l'objet de ce mémoire, a porté sur les deux points suivants :

- Dans un premier temps, nous avons réalisé l'étude structurale des complexes binaires (enzyme + NAD^+) des enzymes mutées C149A et C149S, cristallisées dans des conditions exemptes de tout anion. En effet, la plupart des structures de GAPDH résolues jusqu'ici présentent des sites Pi et Ps occupées par des anions sulfates ou phosphates issus des milieux de cristallisation riches en sulfate ou phosphate. Le but de cette étude structurale préliminaire était de vérifier que les mutations (C149A et C149S) n'ont provoqué aucune modification conformationnelle au niveau du site actif par rapport à l'enzyme de type sauvage. Cette condition était indispensable pour valider les résultats obtenus sur les complexes ternaires.
- Dans un deuxième temps, nous avons étudié les structures des complexes ternaires des holoenzymes mutées C149A et C149S en présence du substrat physiologique (*G3P*). Cette deuxième partie avait pour objectif d'observer le substrat naturel dans un site actif de conformation globale quasi identique à celle de l'enzyme de type sauvage. L'analyse des complexes ternaires devait nous permettre :
 - de lever l'indétermination liée au positionnement du phosphate en C₃ du *G3P* (site Pi ou Ps) lors de l'étape d'oxydoréduction, et ainsi de discuter de la validité des modèles proposés par Moras et al. (1975), l'équipe de Wonacott (1987) et Kim et al. (1995).

- de réexaminer les facteurs moléculaires responsables de la spécificité que présente l'enzyme vis-à-vis de l'énantiomère D du G3P, les causes de cette propriété restant encore controversées aujourd'hui.
- De mettre en évidence d'éventuels changements conformationnels liés à la fixation du substrat naturel sur l'enzyme.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Chapitre IV

TECHNIQUES ET PRINCIPES

Chapitre IV : Techniques et principes

IV. 1. Introduction

La détermination de la structure tridimensionnelle d'une macromolécule biologique par radiocristallographie des rayons X fait appel à un ensemble de techniques qui s'inscrivent dans un scénario où chaque étape peut être limitante.

Le premier volet d'une telle étude consiste en l'obtention de monocristaux du matériel biologique à étudier. Ces cristaux doivent satisfaire à certains critères de taille et de qualité. Ils font alors l'objet d'une étude cristallographique préliminaire afin de déterminer les paramètres de la maille cristalline.

L'étape suivante est l'enregistrement et le traitement des données de diffraction de cristaux de la protéine native et des dérivés lourds éventuels. Les jeux de données ainsi obtenus sont des ensembles dont les éléments sont les réflexions d'indices hkl , les intensités de diffraction mesurées (I_{hkl}) correspondantes et l'estimation de l'erreur sur ces intensités (σ).

Le calcul des phases ϕ_{hkl} associées aux modules des facteurs de structure $F_{hkl} = \sqrt{I_{hkl}}$, est nécessaire pour accéder à la carte de densité électronique de la molécule. La densité électronique $\rho(x, y, z)$ se calcule par une synthèse de Fourier (transformée de Fourier inverse) donnée par l'équation

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2i\pi(hx+ky+lz)} \quad (\text{IV-1})$$

où V est le volume de la maille cristalline. La grandeur vectorielle $\overrightarrow{F_{hkl}}$ (*i.e.* le facteur de structure) décrit une onde plane se propageant dans la direction définie par \overrightarrow{OH} où O est l'origine du réseau réciproque et H le nœud (h, k, l) du réseau réciproque. Chaque onde est caractérisée par son amplitude $|\overrightarrow{F_{hkl}}|$ (la mesure expérimentale) et sa phase ϕ_{hkl} , elle s'écrit

$$\overrightarrow{F_{hkl}} = F_{hkl} e^{i\phi_{hkl}} \quad (\text{IV-2})$$

L'enregistrement des intensités diffractées par un cristal de protéine est nécessaire mais non suffisante pour calculer la densité électronique ρ . A partir des spectres de diffraction

nous n'avons accès qu'aux intensités I_{hkl} , i.e. aux amplitudes de diffraction. L'information sur la phase ϕ_{hkl} , associée à chaque intensité mesurée, n'est pas accessible expérimentalement. Le problème de la détermination de la phase est le plus souvent résolu, dans le cas des macromolécules biologiques, par l'une de ces méthodes :

- par la méthode de la série isomorphe à partir de l'interprétation des dérivés lourds. Dans cette méthode, un atome lourd introduit dans une structure d'atomes légers est utilisé comme un atome marqueur qui permettra l'information sur la phase. Cette méthode est plutôt utilisée dans le cas de la détermination de la structure d'une première enzyme d'une famille structurellement méconnue.
- par la méthode du remplacement moléculaire qui consiste à positionner la structure connue d'une protéine homologue dans le cristal à étudier.
- par la méthode de dispersion anormale par de multiples longueurs d'ondes MAD (Multiwavelength Anomalous Dispersion) à partir de dérivés lourds. Les dérivés lourds les plus utilisés pour cette méthode sont des dérivés séléniés, dans lesquels les résidus méthionine des protéines sont substitués par des sélénométhionines. Le sélénium est utilisé comme source de diffusion anormale. Cette méthode connaît un grand succès de nos jours. Elle est en passe de devenir une technique de routine pour la détermination des structures protéiques.

Si la carte de densité est de qualité suffisante, la connaissance de la structure doit permettre la construction d'un modèle tridimensionnel de la molécule. Ce modèle contient de nombreuses erreurs qui se corrigent peu à peu au cours de l'affinement avec l'introduction des contraintes cristallographiques et d'informations chimiques (chiralité, longueur de liaison, angles de valence, *etc.*).

IV. 2. Méthodes d'enregistrement des données à basse température

IV.2.1. Cryocristallographie

1. Introduction

Les techniques de collecte des données de diffraction X de cristaux macromoléculaires à température ambiante connaissent certains facteurs limitants rendant parfois la collecte impossible. Dès lors, les techniques de diffraction des rayons X aux températures cryogéniques deviennent de plus en plus indispensables. La proportion des expériences de cristallographie moléculaire réalisées à température cryogénique est en croissance exponentielle (Garman & Schneider, 1997).

Quels sont les avantages de ces techniques de collecte de données à très basse température pour la cristallographie macromoléculaire ?

A basse température, on observe une diminution considérable des dégradations de cristaux macromoléculaires, dues à l'action des rayons X. Ce facteur d'endommagement a été l'impulsion principale pour le développement des techniques cryogéniques. Contrairement à la plupart des cristaux de petites molécules, les cristaux macromoléculaires sont souvent sujets à une destruction radiative. Ceci est dû à la présence d'une grande quantité d'eau et à son potentiel de diffusion dans le cristal. Cette réduction importante de dégradation par radiation, à basse température, permet une collecte complète à partir d'un seul cristal. De plus, les vibrations atomiques, dépendantes du désordre dynamique dans les cristaux d'une macromolécule particulière, sont très atténuées aux températures cryogéniques. Cette technique permet donc d'augmenter la durée de vie des cristaux sous les rayons X et d'obtenir quelquefois des données de meilleure résolution.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

L'utilisation des techniques cryogéniques permet également d'éviter de monter les cristaux dans les capillaires, améliorant ainsi le rapport signal/bruit créé par l'excès de la liqueur mère et du verre/quartz du capillaire. Cela est particulièrement important pour les expériences menées sur des cristaux faiblement diffractants.

En outre, les méthodes de montage cryocristallographique impliquent moins de manipulations des cristaux que celles menées à température ambiante, simplifiant ainsi la collecte des données de cristaux fragiles. Un autre point important est que les cristaux peuvent être testés au laboratoire puis conservés à température cryogénique pour une utilisation sur un rayonnement synchrotron.

Les premières recherches des effets de la congélation des cristaux de protéines remontent à 1966, quand *Low et al.* (1966) ont été confrontés aux importantes dégradations, par radiation X, des cristaux d'insuline, contenant des atomes lourds. Depuis, de nombreuses techniques se sont développées dans ce domaine

2. La dégradation par la radiation

La dégradation par radiation X constitue depuis longtemps un problème pour la cristallographie macromoléculaire. Cependant, très peu d'études expérimentales, ont été consacrées à l'effet des radiations X sur les monocristaux (Blake & Philips, 1962 ; Dewan & Tilton, 1987 ; Gonzalez & Nave, 1994 ; Gonzalez *et al.*, 1992 ; Haas & Rossmann, 1970 ; Watowich *et al.*, 1995 ; Young *et al.*, 1993 ; Young *et al.*, 1990). Ce phénomène reste mal connu d'un point de vue théorique.

Cette dégradation radiative à température ambiante possède deux composantes : l'une dose-dépendante et l'autre temps-dépendante.

Ces deux composantes peuvent être expliquées par un modèle à deux étapes (Henderson, 1990 ; Nave, 1995). Les photons des rayons X causent des dégradations immédiates aux molécules qu'elles rencontrent, en éjectant des électrons (Jones *et al.*, 1987 ; Symons, 1995), provoquant ainsi des réactions chimiques. Ces événements représentent l'élément dose-dépendant de la dégradation radiative (dégradation radiative primaire). L'autre composante, qui est temps-dépendante (dégradation secondaire), est associée à la présence d'une grande quantité d'eau dans les cristaux des macromolécules biologiques (Matthews, 1968). Cette 'eau cristalline' est la source des radicaux produits par une radiolyse directe des molécules d'eau ou des réactions déclenchées par les radicaux. Les radicaux produits (hydroxyle, hydroperoxyde, oxygène) sont particulièrement dangereux pour les molécules de protéines (Coggle, 1973). En effet, leurs réactions entraînent un certain nombre d'effets allant de l'endommagement local du cristal à sa désintégration complète (Davies, 1987a ; Davies &

Delsignore, 1987c ; Davies *et al.*, 1987b ; Davies *et al.*, 1987d). L'eau dans le cristal facilite aussi la diffusion des radicaux loin de leur lieu de production en favorisant ainsi la percolation de la dégradation dans d'autres régions du cristal.

Par ailleurs, la chaleur produite par le faisceau des rayons X dans le cristal accélère la diffusion, et donc la vitesse de dégradation.

Suivant la nature des expériences de diffraction, le phénomène d'ionisation causé directement par les photons incidents (dégradations radiatives primaires) ne peut pas être évité. Cependant, les processus de diffusion dans le cristal (dégradations secondaires) peuvent être éliminés en travaillant à température cryogénique, où la diffusion atomique dans le cristal devient presque nulle.

3. Principe de la cryoprotection

Le passage du cristal de la température ambiante à une température cryogénique peut l'endommager. La cause majeure de cet endommagement est la contrainte mécanique introduite par l'accroissement de 9 % de son volume spécifique. Ceci est dû à la transition de phase de l'eau, de l'état liquide à l'état de glace hexagonal (glace I_H, figure IV-1). En général, quand l'eau pure est refroidie à une vitesse modérée, les fluctuations de densité dans la phase liquide entraînent la formation de noyaux de taille suffisante pour une croissance cristalline (*nucléation homogène*) (Kanno *et al.*, 1975). La présence des hétérogénéités qui favorisent les points d'initiation pour la cristallisation peut accélérer l'étape de la nucléation, résultant dans une température de solidification élevée (*nucléation hétérogène*). Si le système est refroidi rapidement en comparaison à l'échelle de temps impliquant la cristallisation, seule une cristallisation négligeable apparaît à la température de transition de glace (approximativement 140 K) pour l'eau pure (Angell & Tucker, 1980). Le système se transformera dans une phase glacée rigide et désordonnée : *la vitrification d'eau* (figure VI-1).

4. Rôle des agents cryoprotecteurs

Avec l'addition d'un soluté, la température de liquéfaction devient plus faible et la température de vitrification augmente. En effet, l'ajout d'un soluté à une solution augmente l'entropie de la phase liquide et diminue l'énergie libre de la solution. La force de cristallisation de l'eau devient ainsi faible, et le temps caractéristique pour la cristallisation augmente. Ceci est le principe d'action des agents "*cryoprotecteurs*" ou "*antigivrants*". L'addition de ces derniers permet la suppression de la cristallisation. Ainsi l'état de vitrification sera atteint à une température de refroidissement plus accessible.

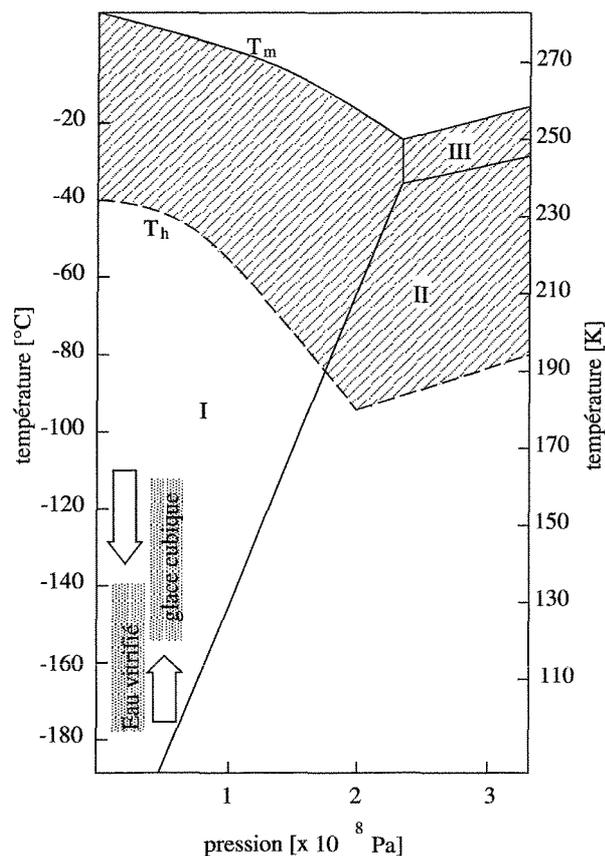


Figure IV-1 : schéma d'une partie du diagramme de phase pression/température pour l'eau pure (Franks, 1985 ; Kanno et al., 1975). Les lignes continues indiquent les frontières des phases entre les trois polymorphes glaces I, II et III et l'eau liquide L. La glace I peut exister en forme hexagonale (I_H) ou cubique (I_C). T_m est la température de liquéfaction. La zone hachurée montre la région dans laquelle l'eau hyper refroidie peut exister. La frontière inférieure de cette zone (ligne discontinue) correspond à la température de nucléation hétérogène T_h (voir texte). Le domaine de température dans lequel l'eau vitrifiée et la glace cubique peuvent exister sont indiquées sous la forme de barres grisées (d'après Garman & Schneider, 1997).

5. Méthodes

Le succès d'une expérience de cryocristallographie repose sur plusieurs paramètres :

- Choix du cristal
- Choix du cryoprotectant
- Choix du système de montage
- Construction des boucles
- Technique de refroidissement rapide et de stockage.

5.1. Cryostats

Une grande variété de systèmes permettant une collecte de données à température cryogénique ont été décrits dans la littérature (Larsen, 1995 ; Rudman, 1976) et un nombre important de systèmes sont disponibles dans le commerce. Durant nos expériences, le système cryogénique Oxford a été utilisé (figure VI-2-a).

Les spécifications de base d'un cryostat impliquent l'accessibilité à un intervalle de température, la fluctuation autour de la température définie et la stabilité à long terme de tout l'appareillage.

En général, sur tous les systèmes cryogéniques commercialisés, la formation de la glace sur le cristal est, en principe, évitée en entourant le faisceau d'azote froid gazeux par un faisceau coaxial de gaz sec (azote ou air) réchauffé qui protège le faisceau froid de toute moisissure atmosphérique et réchauffe la tête goniométrique.

Il est important de protéger la tête goniométrique du givre, qui pourrait bloquer l'enchaînement de la collecte des données. Ceci est accompli en utilisant une tête chauffante (figure VI-2-b).

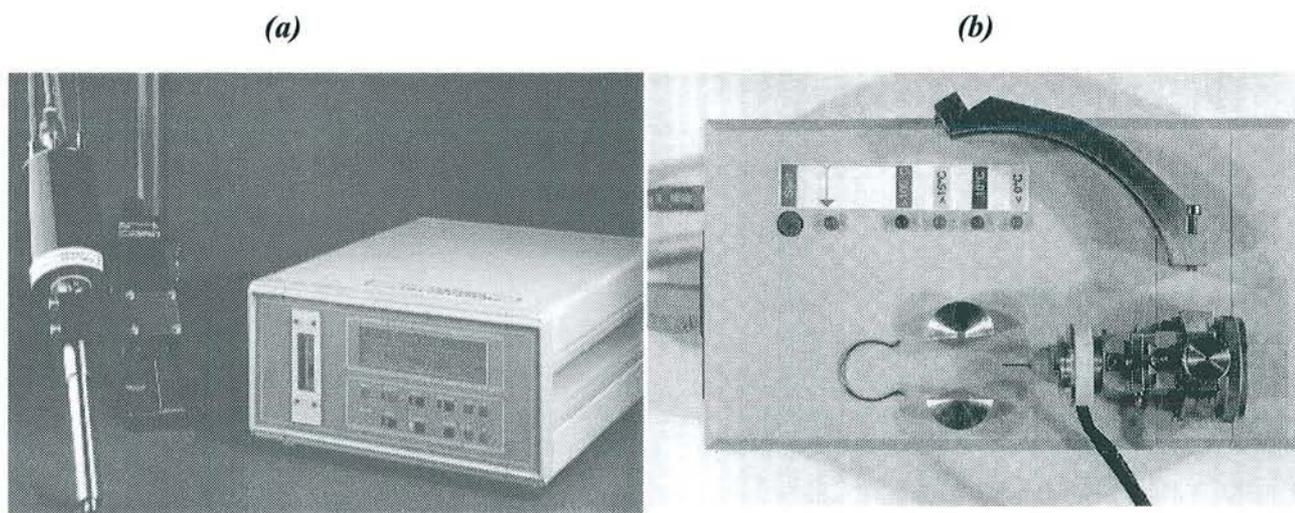


Figure IV-2 : L'appareillage cryogénique utilisé durant nos expériences : (a)(Oxford Cryosystem.) ; (b) Tête goniométrique chauffante

5.2. Choix du cristal

En général, comme pour toute expérience cristallographique, les cristaux doivent être de bonne qualité. Les petits cristaux ou ceux de mauvaise qualité peuvent être utilisés pour les

tests préliminaires. Un grand nombre de cristaux est souvent nécessaire pour les premiers tests cryogéniques.

5.3. Cryoprotecteurs

La tâche principale, et parfois, la plus difficile est d'établir une procédure de refroidissement pour un cristal. Celle-ci inclut la détermination des conditions cryoprotectantes pour la liqueur mère.

Les cryoprotecteurs sont employés pour réduire les vitesses de cristallisation de l'eau du cristal et du solvant, minimisant ainsi toute perturbation du cristal par la formation de la glace, durant la procédure de refroidissement.

Avant d'entamer toute expérience de recherche et d'optimisation des protocoles de refroidissement, les cristaux doivent être bien caractérisés (du point de vue mosaïcité, temps de vieillissement, transport, et collecte de données) à température ambiante. Ceci permettra de séparer clairement ces facteurs et les effets liés aux procédures de refroidissement rapide.

Un grand nombre de composés a été utilisé avec succès pour la cryoprotection des cristaux macromoléculaires (Tableau 1). Cependant, trouver le bon cryoprotecteur pour un système particulier est une question de "tâtonnement". Dans plusieurs cas, la cryoprotection des cristaux obtenus à partir d'un mélange de solution aqueuse/organique ou de tampons de faibles concentrations en sel peut être atteinte facilement par addition de composés organiques (Douzou & Petsko, 1984 ; Fink & Petsko, 1981). Aussi, si un polyéthylène glycol (PEG) avec une masse moléculaire de moins de 4000 ou MPD est utilisé comme agent précipitant, l'augmentation de la concentration du précipitant peut amener à un bon cryotampon.

Tableau IV-1 : Liste de cryoprotecteurs utilisés avec succès dans des expériences de cryocrystallographie macromoléculaire.

Type	Concentration (%)
Glycérol	13-30 (v/v)
Ethylène glycol	11-30 (v/v)
Polyéthylène glycol	25-35 (v/v)
Xylitol	22 (w/v)
(2R,3R)-butanol-2,3-diol	8 (v/v)
Erythriol	11 (w/v)
Glucose	25 (w/v)
E-méthyl-2,4-pentanediol (MPD)	20-30 (v/v)

Dans une première étape, la concentration minimum du cryoprotecteur nécessaire pour vitrifier la liqueur mère doit être établie. La formation de glace dans l'échantillon peut être examinée visuellement : si l'échantillon reste transparent durant le refroidissement, la vitrification a eu lieu, tandis que l'opacité indique la formation de la glace dans le cristal (figure VI-3). Pour confirmer le degré de vitrification dans l'échantillon, une image de diffraction par rayon X doit être enregistrée et examinée pour voir s'il y a des anneaux de diffraction de poudre ('ronds d'eau'), résultant de la diffraction de glace microcristalline.

Une fois que la concentration du cryoprotectant est suffisante pour la vitrification de la liqueur mère, elle doit être incrémentée de 2 à 5 %, de façon à établir une marge de sécurité en présence du cristal. Le diagramme de la figure VI-4 montre la procédure pour tester un cryoprotectant.

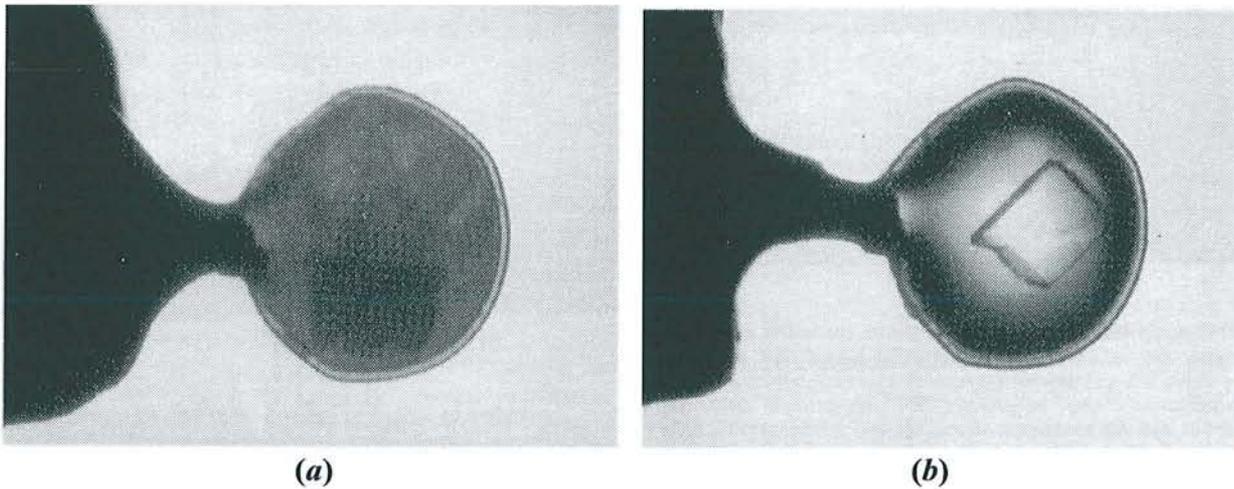


Figure IV-3 cristal suspendu à un film de solution (a) non cryoprotectrice et (b) cryoprotectrice, après un refroidissement rapide (d'après Garman & Schneider, 1997).

Les chocs osmotiques exercés par un cristal quand il est exposé à un cryoprotecteur peuvent être éliminés par des transferts en étapes de la liqueur mère à la solution cryoprotectrice. Ces étapes d'incrémentation de la concentration du cryoprotecteur peuvent être établies soit par un transfert physique du cristal entre les différentes solutions soit par remplacement des solutions respectives laissant le cristal stationnaire. Cette dernière méthode est moins dangereuse pour les cristaux fragiles.

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre entre un cristal et un tampon cryoprotecteur pour une concentration donnée dépend de la taille du cristal, de la nature du solvant qui se canalise dans le cristal, de la température, du coefficient de diffusion du cryoprotectant et d'autres facteurs (Bishop & Richards, 1968). Pour des petits agents cryoprotectants comme le glycérol, des temps de trempage de moins d'une minute peuvent être suffisants (Schneider, 1996a), alors que pour un plus grand cryoprotectant comme les PEGs, les temps de trempage de plusieurs minutes peuvent être nécessaires pour atteindre l'équilibre (Bishop & Richards, 1968 ; Fink & Petsko, 1981 ; Ray *et al.*, 1991).

5.4. Instrumentation pour le montage des cristaux

Une étape importante d'une collecte de données cryocristallographiques est la méthode de montage du cristal et le choix du matériel associé à ce montage. La technique la plus couramment utilisée est la méthode de la boucle décrite par Teng (Teng, 1990). A l'origine, Teng a utilisé une boucle de fil tungstène argenté de diamètre 1-2 mm, pour suspendre le cristal par la tension de surface dans un film fin de la solution cryoprotectrice. Cette méthode a révélé des inconvénients car l'utilisation d'un fil métallique contribue à la diffraction des rayons X. Cette boucle métallique utilisée par Teng a été aussitôt remplacée par des boucles fabriquées à partir de fibres fines (diamètre 10-50 μm), qui ont la caractéristique de ne pas absorber ni diffracter les rayons X. Les fibres utilisées sont les fibres de verre, de Nylon (fil de pêche), du fil dentaire, du coton, du fil chirurgical etc.

Dans cette méthode, l'appareillage du montage du cristal est réduit à une boucle, qui est fixée à une aiguille de seringue. Cette dernière est ensuite montée sur un support en plastique qui peut s'adhérer à la tête goniométrique (figure VI-5). Il existe plusieurs méthodes pour la construction de ces boucles. Différents dispositifs de montage sont aussi commercialisés par Hampton Research, USA.

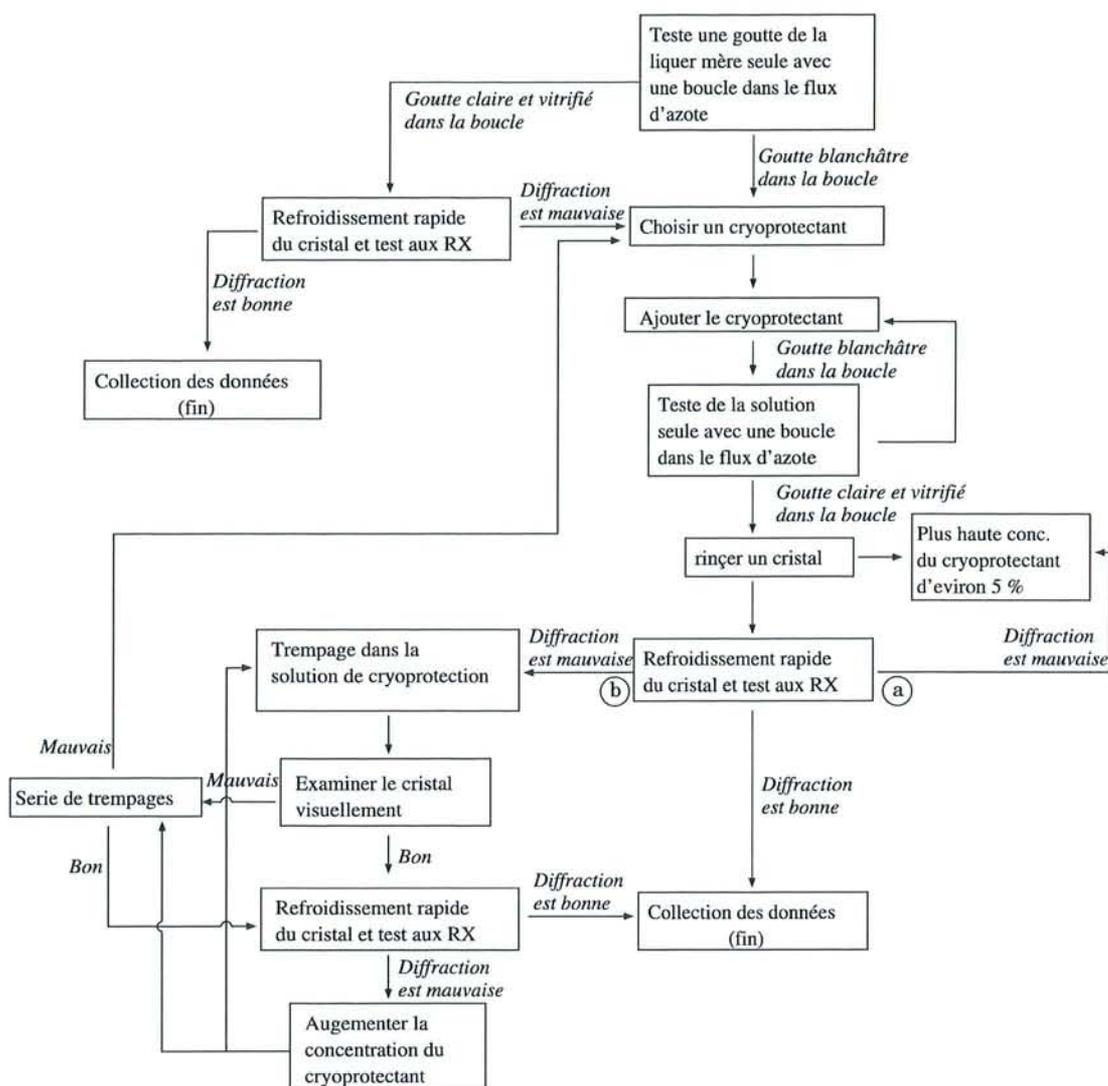


Figure IV-4 : Diagramme montrant les étapes de la recherche d'un cryoprotecteur.



Figure IV-5: Dispositif de montage de cristaux pour les expériences de cryocrystallographie.

5.5. Montage et transfert des cristaux

La taille et la forme de la boucle dépendent de la taille, de la forme et de l'orientation du cristal. Avant le montage, la boucle doit être nettoyée avec de l'alcool ou de l'eau distillée, séchée avec du tissu en papier et préajustée sur la tête goniométrique par rapport au faisceau X.

Après un équilibre final avec la solution cryoprotectrice, le cristal est pêché avec la boucle, en saisissant le cristal par le dessous et en le portant verticalement vers l'extérieur de la goutte. La boucle formera un film de liquide dans lequel le cristal va être entraîné par la tension de surface.

L'évaporation du film est très rapide à cause de son rapport surface/volume. Ainsi, un des paramètres les plus critiques dans une expérience cryocristallographique est le temps entre le montage du cristal dans la boucle et le refroidissement flash. Ce temps doit être aussi court que possible, sinon le cristal peut être déshydraté et les composantes de la solution peuvent précipiter. Le microscope et la tête goniométrique doivent être très proches en évitant tout obstacle entre eux.

5.6. Refroidissement rapide 'Flash cooling'

Comme précédemment décrit (§ 5.2), réussir un refroidissement rapide est indispensable pour éviter la formation de glace. Deux propriétés physiques du cristal combinées peuvent affecter la vitesse de transfert de température durant le flash cooling. Celles-ci sont la conduction de température à l'intérieur du cristal et la forme du cristal, en particulier son rapport surface/volume. La vitesse de conduction de température varie entre différents types de cristaux. Elle dépend de certaines propriétés particulières des cristaux de protéines (contenu en solvant, empilement, composition de la liqueur mère *etc.*) et ne peuvent pas être facilement contrôlées par l'expérimentateur.

Il existe deux méthodes principales pour vitrifier un cristal :

1. L'exposition rapide à un flux d'azote gazeux (le point de liquéfaction (PL) est à 63 K ; le point d'ébullition (PE) est à 78 K) associé au diffractomètre.
2. L'immersion du cristal dans un liquide cryogénique comme l'azote, le propane (Thomanek *et al.*, 1977) (PL 86 K ; PE 231 K), éthane (PL 90 K ; PE 184 K), fréon 12 (PL 115 K ; PE 243 K), fréon 22 (PL 113 K ; PE 233 K) ou méthylcyclopentane (Ray *et al.*, 1991) (PL 130 K ; PE 345 K).

Dans les deux cas, le procédé doit être rapide afin d'assurer une solidification amorphe du solvant entourant le cristal et permettre une congélation isotrope de tout le contenu de la boucle.

5.7. Stockage et transport des cristaux

Un des énormes avantages de la cryocristallographie est le potentiel de stockage et de transport des cristaux une fois qu'ils sont vitrifiés. Il y a plusieurs raisons pour lesquelles celui-ci peut être bénéfique :

1. Les cristaux peuvent être inspectés à 100 K au laboratoire et ceux de meilleure qualité seront sélectionnés pour une collecte de données au synchrotron.
2. Les cristaux peuvent croître jusqu'à une taille limite et après se dégrader. Ces cristaux peuvent être congelés dans leur condition optimale et gardés jusqu'à ce que la collecte de données soit possible.
3. Les données requises ne nécessitent pas d'être toutes prises dans un premier temps. Une collecte complète peut être effectuée ultérieurement sur le même cristal.
4. Les cristaux fragiles souffrent moins d'endommagement durant les transports.

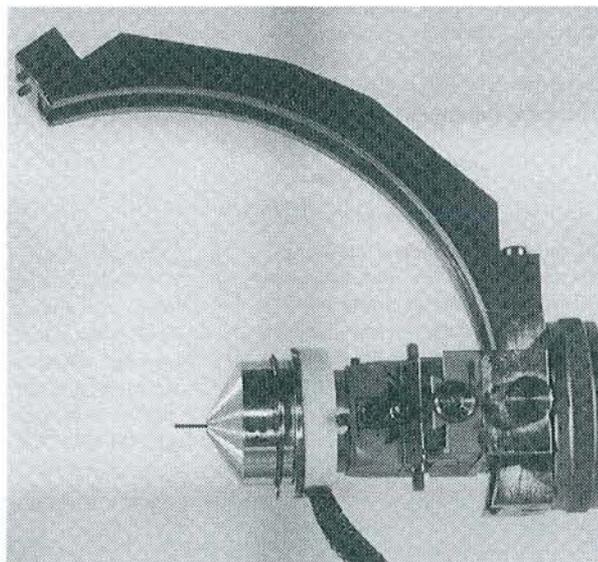


Figure IV-6 : appareillage de stockage des cristaux (d'après Litt et al., 1998)

L'aimant d'attachement de la boucle est monté sur une tête goniométrique, équipée d'un arc supplémentaire permettant la rotation de la tête goniométrique et d'une plateforme amovible (figure VI-6). Cet arrangement permet au cristal de rester dans la même position dans le faisceau d'azote lors du déplacement de la plate-forme sur l'arc. Une petite fiole, 'tube cryogénique', en plastique, remplie d'un liquide cryogénique est ensuite

introduite autour du cristal et vissée à la base de la boucle. Le tout est enlevé pour être stocké immédiatement dans l'azote liquide, en vue d'une utilisation ultérieure.

6. Applications

L'utilisation des techniques cryogéniques a eu un grand impact sur plusieurs domaines de la biocristallographie.

Les déterminations des structures utilisant les méthodes 'classiques' de phasage, basées sur les méthodes de remplacement isomorphe (MIR) et de remplacement moléculaire, ont profité de la haute qualité des données obtenues à partir de cristaux congelés (Brown *et al.*, 1993 ; Nissen *et al.*, 1995). En effet, dans plusieurs cas où la résolution de la structure avec la méthode MIR n'est pas possible à partir d'une collecte de donnée à température ambiante, à cause de dégradation radiative, des cartes de densité électronique initiales interprétables pourraient être obtenues à partir des données collectées à basse température (Lima *et al.*, 1994).

Les méthodes de dispersion anormale multiple (MAD) (Hendrickson, 1991) sont devenues plus fréquemment utilisées, avec la croissance de la disponibilité des sources de radiations synchrotron. Puisque ces méthodes reposent sur des petites différences entre les facteurs de structure mesurés, une collecte de données précises à basse température est indispensable.

Les méthodes *Ab initio* (*i.e.* celles basées seulement sur les facteurs de structures mesurés) pour les résolutions structurales ont été récemment appliquées avec succès à plusieurs grand oligopeptides et petites protéines (Pohl *et al.*, 1995). L'utilisation des techniques cryogéniques étendront significativement le nombre de structures qui peuvent être résolues par ces méthodes, qui reposent sur des données complètes de haute qualité et à haute résolution.

Les méthodes cryogéniques ont parfois permis d'enregistrer des collectes de données à des résolutions meilleures que 1 Å pour des cristaux macromoléculaires (Dauter *et al.*, 1995). Le grand nombre de réflexions uniques contenues dans de telles collectes de données permet un affinement détaillé du modèle. En principe, les contraintes habituellement utilisées pour les affinements des macromolécules peuvent être relâchées ou complètement enlevées, permettant une vision non biaisée de la géométrie macromoléculaire. Des paramètres additionnels peuvent être affinés incluant les paramètres de déplacement anisotropique et de désordre. L'analyse de telles grandeurs peut amener à de nouvelles visions des propriétés des protéines dans l'état cristallin (Schneider, 1996b ; Stec *et al.*, 1995).

Les expériences cryoenzymologiques au sein des cristaux (Douzou & Petsko, 1984 ; Fink, 1976 ; Fink & Petsko, 1981 ; Makinen & Fink, 1977) permettent la caractérisation structurale des états de transition des réactions catalytiques des protéines. Une fois peuplés à un degré suffisant, ces états de transitions peuvent être stabilisés par la congélation du cristal permettant ainsi une collecte de données RX (Chen & Herzberg, 1992 ; Ding *et al.*, 1994 ; Rasmussen *et al.*, 1992). Cependant, dans certains cas, des températures bien inférieures à 77K sont nécessaires pour permettre de caractériser des états de non équilibre, comme par exemple dans l'étude cristallographique de la carbomonoxy-myoglobine photolysée (T = 33 K) (Hartmann *et al.*, 1996 ; Schlichting *et al.*, 1994 ; Teng *et al.*, 1994). De même, la préservation d'un état rédox défini durant la collecte des données cristallographiques présente certains problèmes à température ambiante. Ces derniers peuvent être résolus par la stabilisation du système à température cryogénique (Day *et al.*, 1992 ; Watt *et al.*, 1991).

Les études cristallographiques des cristaux de protéines membranaires et des virus sont expérimentalement difficiles. L'application des méthodes cryogéniques apporte une promesse pour contourner certains problèmes et encourage son avancement (Hobough *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1995). De plus, il est devenu possible de déterminer, grâce aux études à basse température, la structure de très grandes molécules ainsi que des complexes multiprotéiques (Andersen *et al.*, 1994 ; Braig *et al.*, 1994 ; Volkmann *et al.*, 1990).

S.C.D. - U.N.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Chapitre V

RESULTATS

Chapitre V : Résultats

Ce chapitre commence par un paragraphe décrivant les préparations des enzymes utilisées suivi d'une partie donnant les modes opératoires qui ont permis d'obtenir les différentes formes cristallines. La section suivante est consacrée aux collections des données des complexes binaires et des complexes ternaires. Enfin, les deux dernières parties traitent de la détermination des phases et de l'affinement des complexes étudiés.

1. Production, purification et caractérisation des GAPDH de *B. stearothermophilus*

1.1. Production et purification

La purification et la caractérisation de l'enzyme de type sauvage et des mutants ont été réalisées au laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire de l'Université Henri Poincaré de Nancy I (MAEM UHP NANCY I).

L'enzyme de type sauvage et les enzymes mutées C149A et C149S ont été produites par des souches d'*Escherichia coli* W3CG dont le gène codant pour la GAPDH (Gap A) est interrompu par un transposon, et qui présente donc la particularité de ne pas produire de GAPDH endogène. Ceci permet d'éviter de contaminer l'enzyme de la GAPDH de *B. stearothermophilus* par l'enzyme sauvage d'*E. coli*. Les mutants C149A et C149S de la GAPDH ont été obtenus par mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel (Kunkel *et al.*, 1991). Le taux d'expression de l'enzyme mutée est du même ordre que celui de l'enzyme de type sauvage, soit environ 80 mg d'enzyme par litre de culture dans le surnageant de sonication. Les enzymes de type sauvage ou mutées ont été purifiées jusqu'à homogénéité en utilisant le même protocole (Muller-Boschi, 1997). Ce protocole se compose de trois étapes :

- ✓ une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium ;
- ✓ une colonne de filtration sur gel ACA 34 ;
- ✓ une colonne échangeuse d'anion Q-Sépharose.

Le rendement de purification des GAPDH mutées est comparable à celui de l'enzyme de type sauvage (30 à 40%) avec environ 30 mg d'holoenzyme pure par litre de culture.

Des analyses par spectrométrie de masse pour vérifier la masse du monomère, ainsi que le dosage des résidus cystéine présents dans l'enzyme, en utilisant le dithionitrobenzoate (DTNB) comme sonde chimique, ont confirmé que les protéines purifiées correspondaient bien aux mutants C149A et C149S de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. En effet, ces mutants présentent des masses respectivement de 35928 ± 2 Da et 35912 ± 2 Da, comme attendu. Aucune cystéine n'est accessible au DTNB dans des conditions natives, contrairement à l'enzyme de type sauvage, et une seule cystéine est accessible dans des conditions dénaturantes, ce qui confirme l'absence de la Cys149.

1.2. Activité GAPDH de l'enzyme de type sauvage et des mutants C149A et C149S

Les paramètres cinétiques de la GAPDH de type sauvage et des mutants C149A et C149S ont été déterminés (Muller-Boschi, 1997). Les résultats de ces analyses sont résumés dans le tableau V-1 :

Tableau V-1 : Paramètres cinétiques de la GAPDH de type sauvage et des mutants C149S et C149A de *B. stearothermophilus*.

		Type sauvage	Mutant C149S	Mutant C149A
$K_M(\text{G3P})$	(mM)	$0,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$	-
$K_M(\text{Pi})$	(mM)	15 ± 2	N.D.	-
k_{cat}	(s^{-1})	88 ± 5	$(8 \pm 1) \cdot 10^{-3}$	Inactif

L'activité du mutant C149S est fortement altérée par rapport à l'enzyme de type sauvage. En effet, une diminution du k_{cat} d'un facteur $1,1 \cdot 10^4$ à pH 8,9 est observée pour le mutant C149S par rapport à l'enzyme de type sauvage, sans modification notable des constantes d'affinité apparente pour les substrats G3P (Tableau V-1). Cette diminution drastique de l'activité est accompagnée d'un changement de l'étape limitante. En effet, l'analyse de la première étape de la réaction (acylation), en absence de phosphate et à concentration saturante en substrat, n'a pas permis d'observer une accumulation de l'intermédiaire acylenzyme, comme c'est le cas pour l'enzyme de type sauvage. Cela implique que l'étape d'acylation est devenue alors limitante pour le mutant C149S. Le K_M pour le phosphate inorganique n'a pas pu être mesuré (Muller-Boschi, 1997).

Le mutant C149A est complètement inactif vis-à-vis des substrats (G3P, phosphate inorganique et 1,3dPG). Une détermination des valeurs de K_M n'a donc pas été possible pour ce mutant.

2. Cristallisation

Dans le but d'étudier la structure tridimensionnelle du complexe ternaire (*GAPDH*, NAD^+ et *G3P*), il a été nécessaire de cristalliser les enzymes mutées (C149A et C149S) dans une solution d'agent précipitant exempt de tout anion susceptible d'occuper les sites de fixation du phosphate du substrat (Ps) et/ou du phosphate inorganique (Pi). La condition de cristallisation précédemment utilisée (agent précipitant : sulfate d'ammonium) pour résoudre les structures de la *GAPDH B. stearotherophilus* (Skarzynski et al., 1987; Skarzynski & Wonacott, 1988) ne convenait pas à notre étude (Tableau V-2).

Tableau V-2 : Condition de cristallisation antérieurement utilisée pour la résolution de la *GAPDH* de *B. stearotherophilus*

Concentration en enzyme de <i>GAPDH</i>	7 mg/ml
Sulfate d'ammonium (agent précipitant)	2,3 M
Phosphate, pH 6,9 (solution tampon)	50 mM

2.1. Préparation de l'enzyme

L'enzyme est dialysée 2 fois, pendant 24 heures dans un boudin de dialyse, contre 500 ml de la solution Tris-HCl 50 mM à pH 8.0, EDTA 2mM, DTT 2mM, NAD^+ 1.5 mM. Le but de cette dialyse est d'éliminer les traces de sels, principalement le sulfate d'ammonium, ajoutés pour la conservation de l'enzyme.

La solution protéique est ensuite concentrée à 4°C par ultrafiltration, à l'aide d'un microconcentrateur Centricon-10 (Amicon)⁽¹⁾, dans une centrifugeuse ⁽²⁾ à rotor à angle fixe, jusqu'à une concentration proche de celle voulue pour la cristallisation. La concentration en protéine est déterminée par une mesure de densité optique, à l'aide d'un spectrophotomètre UV à double faisceaux, aux longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm. Enfin, la solution est ajustée à 28 mg/ml en protéine. L'enzyme ainsi solubilisée se conserve seulement quelques jours à 4°C.

(1) Le seuil de fractionnement du poids moléculaire est de 10 kDa

(2) Centrifugeuse de marque Jouan MR 1822 (vitesse 4500 g ; temps 35 min)

2.2. Cristallisation

2.2.1. Mode opératoire

Toutes les expériences de cristallisation ont été effectuées, dans une pièce thermostatée à 20°C, suivant la méthode de diffusion en phase vapeur (Ducruix & Giegé, 1992), par la technique de la goutte suspendue. La goutte est suspendue sur des lamelles préalablement silanisées. Ces lamelles sont disposées au-dessus de petits réservoirs dont les bords ont été graissés afin d'assurer l'étanchéité du système. Des boîtes Linbro (pour culture de tissus), pouvant réunir 24 puits, sont utilisées comme support pour cette méthode de cristallisation.

Pour la silanisation des lamelles, ces dernières sont lavées au détergent puis rincées à l'eau distillée et séchées. Elles sont ensuite placées dans une boîte en verre avec deux coupelles contenant chacune 500 µl de solution de silanisation (2% en volume de diméthyl-dichloro-silane dans du 1,1,1-trichloroéthane). Le tout est placé dans une étuve, pendant 1 heure à 90 °C.

2.2.2. Résultats

La recherche d'une condition de cristallisation autre que celle utilisée ultérieurement pour l'enzyme de type sauvage de *B. stearothermophilus* (Biesecker et al., 1977; Skarzynski et al., 1987), était la première difficulté du projet. Trois nouvelles conditions de cristallisation ont été obtenues en utilisant la matrice d'échantillonnage (Jancarik & Kim, 1991). Des cristaux (figure V-1) du mutant C149A (condition A) ont été obtenus dans un premier temps à partir d'une solution de tri-citrate de sodium 0,2 M et 2-propanol 20% dans un tampon HEPES-Na 0,1 M pH 7,5 (tableau V-3). Cette condition de cristallisation a aussitôt été abandonnée car le citrate aurait pu entrer en compétition avec le NAD^+ pour l'occupation du site du cofacteur et ainsi créer une hétérogénéité des complexes dans le cristal. En effet, l'étude structurale de la GAPDH d'*E. coli* a montré que la présence du citrate dans la solution de cristallisation diminue fortement l'affinité de l'enzyme pour le cofacteur NAD^+ (Duée et al., 1996).

Tableau V- 3: Conditions de cristallisation

	Condition A	Condition BI	Condition BII
Technique de cristallisation		Goutte suspendue	
Enzyme	Mutant C149A	Mutant C149A	Mutant C149S
Concentration initiale en protéine	7 mg/ml	7 mg/ml	9,3 mg/ml
Condition de cristallisation	HEPES-Na 0,1 M 2-propanol 20% EDTA 2mM DTT 2mM Azide 0,1 mM NAD 2 mM	Acétate de sodium 100mM EDTA 2mM DTT 2mM Azide 0,1 mM NAD 1,5 mM	Tris-HCl 100 mM Na Acét.100mM EDTA 2mM DTT 2mM Azide 0,1 mM NAD 1,5 mM
pH	7,5	4,6	7,5
Agent précipitant	tri-citrate de sodium 0,2 M	PEG4000 8% (v/m) ¹	PEG 4000 10% (v/m) ¹
Température	4 °C	20 °C	20 °C
Temps de croissance	3 mois	1 semaine	2 semaines
Taille typique des cristaux	2,4 × 0,5 × 0,3 mm ³	1,6 × 1,0 × 0,4 mm ³	1,0 × 0,7 × 0,4 mm ³

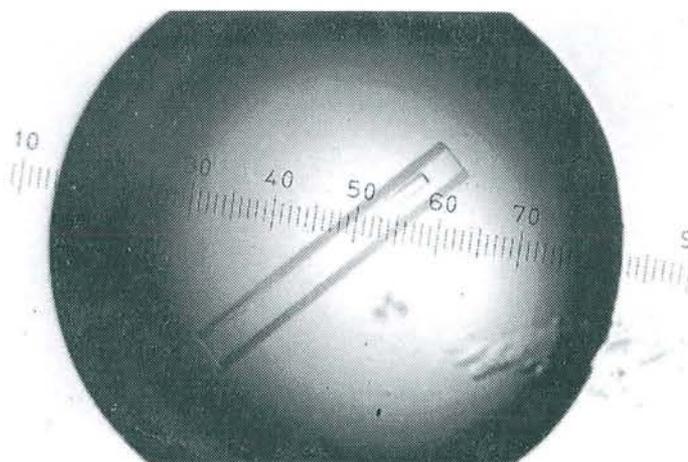


Figure V- 1 : Cristal du mutant C149A de la GAPDH de type sauvage de *B. stearothermophilus* (forme A).

¹ volume/masse

Nous avons ensuite réussi à obtenir une nouvelle condition (tableau V-3) de cristallisation pour le mutant C149A (notée condition BI) en utilisant le Polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000) comme agent précipitant à pH 4,6. Cette deuxième condition (condition BI) s'est malheureusement révélée improductive dans la cristallisation du mutant C149S. Une troisième condition a alors été mise au point pour cristalliser le mutant C149S où le pH est 7,5 et l'agent précipitant est un mélange du PEG 4000 et d'acétate de sodium (tableau V-3). Il est intéressant de noter que cette dernière condition (notée condition BII), de par son pH (7,5), mime mieux les conditions physiologiques que la condition BI (pH 4,6).

Contrairement aux cristaux du mutant C149A, les cristaux de l'enzyme mutée C149S sont très fragiles, ce qui a rendu leur manipulation difficile.

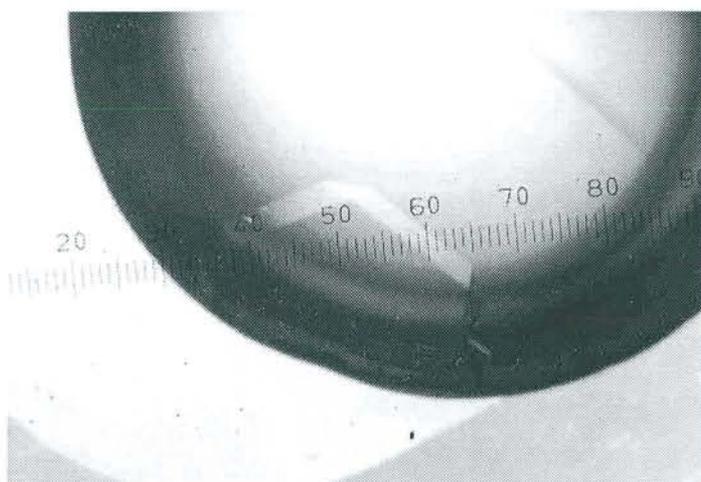


Figure V- 2 : Cristal du mutant C149A de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (forme BI).

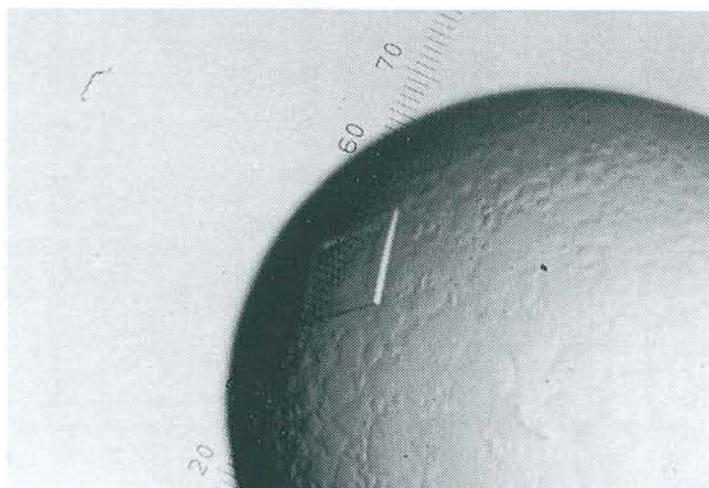


Figure V- 3 : Cristal du mutant C149S de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (forme BII).

Remarque

Les problèmes de multinucléation, rencontrés dans des gouttes contenant des proportions équivalentes en volume d'agent précipitant et de protéine, ont été évités en optimisant la cinétique d'équilibration de la goutte, ceci en variant les proportions d'agent précipitant et de protéine (Ducruix & Giegé, 1992) :

- pour les formes cristallines AI et BI, les gouttes contiennent une proportion de 1/4 de leur volume total en protéine et de 3/4 en solution du réservoir,
- pour la forme cristalline BII, les gouttes contiennent une proportion de 1/3 de leur volume total en protéine et de 2/3 en solution du réservoir.

Ceci permet une équilibration plus lente entre la goutte et le réservoir et d'obtenir ainsi des cristaux de meilleure qualité apparente (figures V-1, V-2, V-3).

3. Enregistrement des données

3. 1. Introduction

Les différents enregistrements ont été réalisés au laboratoire à l'aide d'un générateur de rayons X à anode tournante (Nonius FR591 : anode Cuivre, 45 kV, 90 mA, $\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$). Le faisceau des rayons X est monochromatisé grâce à un système de focalisation utilisant un double miroir. Les intensités de diffraction des rayons X ont été enregistrées à l'aide d'un détecteur à plaque photosensible (*Dip2030*) appelé "Image Plate". Ce détecteur bidimensionnel est équipé de deux plaques photosensibles de diamètre 30 cm (figure V-4). Le diffractomètre est équipé d'un système cryogénique (Oxford Cryosystem, G.B.) à flux d'azote gazeux, permettant de travailler à basses températures. Une tête goniométrique à tête chauffante est utilisée pour éviter la formation de givre autour du cristal. (cf. chapitre IV, paragraphe 1)

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54500 VILLERS-LES-NANCY

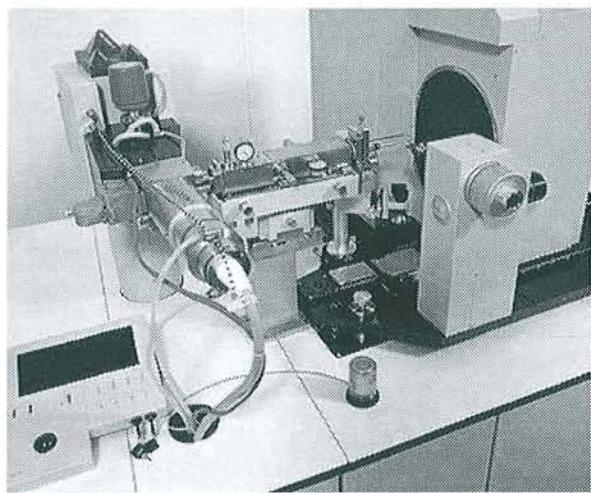


Figure V- 4 : Photo du diffractomètre à Image Plate 2030 de Nonius

3. 2. Analyse cristallographique préliminaire

Les mesures préliminaires de diffraction X sur les cristaux des mutants ont révélé deux nouvelles formes cristallines : hexagonale pour les cristaux du mutant C149A et monoclinique pour ceux du mutant C149S (tableau V-4).

Tableau V- 4 : Caractéristiques de la maille cristalline des cristaux du mutant C149A (forme BI) et du mutant C149S (forme BII)

Système cristallin	Hexagonal	Monoclinique
Groupe d'espace	$P3_121$	$C2$
Paramètres de la maille	$a=b=115,54 \text{ \AA} ; c=224,53 \text{ \AA} ;$	$a= 140,48 \text{ \AA} ; b=87,91 \text{ \AA} ;$ $c=119,92 \text{ \AA} ; \beta=119^\circ$

L'indexation des données extraites du détecteur bidimensionnel a été réalisée par le programme *Denzo* du logiciel *HKL* (Otwinowski & Minor, 1996). Ce dernier utilise un nouvel algorithme d'indexation, basé sur une recherche complète de tous les vecteurs de l'espace direct dont les normes appartiennent à l'intervalle défini par l'utilisateur. A partir de ces vecteurs, le logiciel détermine le triplet correspondant aux 3 axes (a, b, c) du cristal, qu'il compare avec les 14 réseaux de Bravais en accordant à chacune des comparaisons un facteur d'accord. La vérification de la solution la mieux adaptée se fait par affinement des paramètres

de la géométrie du système (position du faisceau par rapport au cristal, distance cristal-détecteur, paramètres cristallins ...).

Ces analyses cristallographiques préliminaires ont montré que les cristaux des mutants se dégradent très rapidement quand ils étaient exposés aux rayons X à température ambiante. Nous avons donc utilisé la méthode de cryocristallographie pour les collectes des données.

4. Conditions de cryoprotection et transfert des cristaux

4.1. introduction

Dans la recherche d'une condition de cryoprotection, la composition de la liqueur mère a tout d'abord été prise en compte. En effet, le PEG peut, à lui seul, être un cryoprotecteur pour les cristaux macromoléculaires (Garman & Schneider, 1997; Petsko, 1975). Des solutions de concentrations différentes en PEG ont été préparées. De plus, d'autres additifs ont été testés pour préparer des solutions cryoprotectrices :

- Glycérol ;
- 2-méthyl-2,4-pentadiol (MPD) ;
- Glucose ;
- Ethylène glycol.

4.2. Complexe binaire I (forme BI)

Les premiers tests de congélation rapide des cristaux du mutant C149A ont été effectués avec un mélange de la solution du puits et des cryoprotecteurs (cités ci-dessus). Seule la solution contenant du MPD a permis une vitrification de la goutte. La concentration du MPD a été optimisée à 22%. Pour confirmer le degré de vitrification dans la goutte, une image de diffraction par rayon X est enregistrée et examinée afin de voir s'il y a des cercles de diffraction de glace microcristalline ('ronds d'eau').

Après avoir déterminé la concentration du cryoprotecteur nécessaire à la vitrification de la liqueur mère seule, cette concentration est augmentée de 3 % pour la vitrification des cristaux (Garman & Schneider, 1997; Rodgers, 1994; Rodgers, 1996). Ceci permet une marge de sécurité pour cette étape où un plus grand volume doit être refroidi (liqueur mère + cristal). La boucle, choisie pour transférer le cristal, est centrée au préalable sur le faisceau des rayons X.

Le cristal est prélevé de sa goutte puis trempé dans un puits contenant la solution cryoprotectrice. Le temps nécessaire pour l'équilibration entre le cristal et la solution cryoprotectrice a été ajusté à 10 minutes (Tableau V-5).

Tableau V- 5 : caractéristiques de cryoprotection des cristaux des complexes binaires I et II.

	<i>Complexe binaire I</i>	<i>Complexe binaire II</i>
<i>Cryoprotecteur</i>	<i>MPD</i>	<i>MPD</i>
<i>Concentration en cryoprotecteur</i>	<i>25 % (v/v)</i>	<i>30 % (v/v)</i>
<i>Temps de trempage</i>	<i>10 minutes</i>	<i>10 minutes</i>

Le cristal est ensuite monté sur la boucle et placé sur la tête goniométrique, tout en bloquant le faisceau d'azote froid (100K) par une plaquette. Une fois le cristal positionné, la plaquette est retirée, aussi rapidement que possible, pour provoquer une congélation rapide.

4. 3. Complexe binaire II (forme BII)

Le MPD a été utilisé comme additif pour la préparation de la solution cryoprotectrice des cristaux du mutant C149S. Cette condition a été optimisée à une concentration de 30 % en MPD (tableau V-5). Le temps de trempage, la méthode de transfert et de montage des cristaux est la même que celle décrite pour les cristaux de la forme BI.

Si les cristaux du mutant C149A (forme BI) n'ont causé aucun problème lors des transferts et des montages, la cryoprotection et le transfert des cristaux du mutant C149S se sont, au contraire, révélés très difficiles. Les gouttes de cristallisation présentent un film à la surface, contre lequel les cristaux très fragiles adhèrent.

4.4 Préparation du substrat pour les complexes ternaires

Les cristaux des complexes ternaires ont été préparés avec le composé DL-G3P. La préparation de ce composé a été réalisée à partir du sel de monobarium de DL-glycéraldéhyde-3-phosphate diéthylacétal (Sigma Chemical), au laboratoire de Maturation des

ARN et Enzymologie Moléculaire de l'Université Henri Poincaré de Nancy I (MAEM UHP NANCY I). La concentration des échantillons fournis est de 40 mM.

Les cristaux des complexes ternaires peuvent être préparés soit par diffusion du substrat dans le cristal, soit par cocrystallisation. Cette dernière n'est pas possible, dans notre cas, car le substrat a une durée de vie beaucoup plus courte (24 heures environ) que le temps de cristallisation (1 semaine pour les cristaux du mutant C149A et 2 semaines pour les cristaux du mutant C149S). De plus, pour le complexe ternaire II, le mutant C149S est faiblement réactif, et une réaction pourrait avoir lieu bien avant la nucléation. La méthode de diffusion du substrat G3P dans les cristaux a donc été choisie pour la préparation des cristaux de complexes ternaires.

Les deux complexes ternaires ainsi préparés seront nommés complexe ternaire I et complexe ternaire II, pour désigner respectivement les complexes ternaires (mutant C149A+NAD⁺+G3P) et (mutant C149S+NAD⁺+G3P).

4.5. Complexe ternaire I (mutant C149A+NAD⁺+G3P)

Le complexe ternaire a été préparé en ajoutant un très large excès de G3P dans la goutte contenant le cristal. Un volume de 0,3 µl contenant le substrat est ajouté dans la goutte de cristallisation de volume 6 µl. La concentration du substrat dans la liqueur mère est de 1,9 mM (soit un rapport G3P/GAPDH de 12). Le temps de trempage est de 20 minutes. Le tableau V-6 résume les conditions de préparation du complexe ternaire I.

Tableau V- 6 : Concentrations et volumes de substrat et liqueur mère pour la préparation des complexes ternaire I et II.

<i>Enzyme</i>	<i>Mutant C149A/C149S</i>
<i>Substrat</i>	<i>G3P</i>
<i>Concentration initiale en substrat</i>	<i>40 mM</i>
<i>Volume de la goutte (après équilibration)</i>	<i>6 µl</i>
<i>Volume de substrat ajouté</i>	<i>0,3 µl</i>
<i>Rapport substrat/Enzyme</i>	<i>~12 fois</i>

Après ce trempage dans la solution contenant le substrat, le cristal est transféré dans une goutte assise contenant la même solution de cryoprotection que celle du complexe binaire

I (tableau V-5). Le temps de trempage pour l'équilibre entre le cristal et la solution cryoprotectrice est de 10 minutes. La méthode de transfert et de montage des cristaux est la même que celle décrite pour les cristaux du complexe binaire I.

4.6. Complexe ternaire II (mutant C149S+NAD⁺+G3P)

Les cristaux du complexe ternaire II ont été préparés de la même manière que ceux du complexe ternaire I (tableau V-6). Contrairement aux cristaux du mutant C149A, la diffusion du substrat G3P dans les cristaux du mutant C149S provoque leur détérioration. Ce problème a été contourné en écourtant le temps de trempage à 15 minutes maximum. Au-delà, les cristaux commencent à se fissurer, puis se cassent complètement durant le transfert vers la solution de cryoprotection.

La cryoprotection de ce complexe ternaire est la même que celle du complexe binaire II (tableau V-5). Cependant, la fragilité des cristaux est accentuée par l'ajout de la solution du substrat dans la goutte de cristallisation. Ceci a rendu difficile leur transfert entre la solution cryoprotectrice et la tête goniométrique. Le temps de trempage a aussi été écourté à 5 minutes.

5. Conditions de mesures

Pendant la collecte des données le générateur à anode tournante a été réglé à une puissance de 4,05 kW (45 kV, 90 mA, $\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$). La distance cristal/détecteur est fixée de manière à obtenir des taches de diffraction au bord de la plaque. L'orientation du cristal par rapport au faisceau de rayon X est quelconque. Le cristal effectue une oscillation de 1° suivant l'axe Φ , pour chaque exposition. Les temps d'exposition ainsi que les résolutions maximales atteintes pour les cristaux sont donnés dans le tableau V-7.

Tableau V- 7 : Caractéristiques des mesures des cristaux des mutants C149A (forme BI) et C149S (forme BII).

	<i>Complexe binaire I</i>	<i>Complexe binaire II</i>	<i>Complexe ternaire I</i>	<i>Complexe ternaire II</i>
<i>Durée d'exposition</i>	<i>30 minutes</i>	<i>20 minutes</i>	<i>30 minutes</i>	<i>30 minutes</i>
<i>Distance cristal/détecteur</i>	<i>170 mm</i>	<i>150 mm</i>	<i>170 mm</i>	<i>150 mm</i>
<i>Nombre d'images collectées</i>	<i>90</i>	<i>180</i>	<i>90</i>	<i>180</i>
<i>Résolution limite</i>	<i>2.18 Å</i>	<i>2.1 Å</i>	<i>2.18 Å</i>	<i>2.00 Å</i>

6. Intégration et réduction des données

Les données mesurées sont converties en intensités intégrées. Cette conversion comprend deux étapes, l'une consiste à l'indexation et l'intégration des taches, l'autre à la réduction et la mise à l'échelle des intensités ainsi obtenues.

Les données extraites du détecteur bidimensionnel ont été traitées par le logiciel *HKL* (Otwinowski & Minor, 1996). Il consiste en 3 programmes : *XdisplayF* pour la visualisation du cliché de diffraction, *Denzo* pour la réduction et l'intégration, et *Scalepack* pour la fusion et la mise à l'échelle des intensités obtenues par Denzo. Les statistiques d'enregistrement des données des différents complexes sont détaillées dans le tableau V-8.

Avant d'entamer la procédure de remplacement moléculaire, le fichier de sortie de Scalepack, contenant les moyennes des intensités, a été traité par le programme *TRUNCATE* de *CCP4* (CCP4, 1994). Ce programme calcule les facteurs de structure F_{hkl} et les estimations des erreurs σ_{hkl} par la méthode de French et Wilson (French & Wilson, 1978).

Tableau V- 8 : statistiques d'enregistrement des données des complexes binaires et ternaires I et II.

a) Complexe binaire I

Résolution (Å)	Intensité moyenne	Sigma moyen	$\langle I/\sigma(I) \rangle$	R _{merge} (%)	Nombre de Réflexions	Complétude
4,56	4455,4	162,4	27,43	3,9	9131	94.0
3,68	5786,3	212,3	27,26	4,5	9256	97.8
3,23	4196,1	196,7	21,33	5,1	9272	98.6
2,94	2542,8	159,4	15,95	6,2	9145	97.6
2,74	1726,7	138,7	12,45	7,3	8851	94.7
2,58	1380,1	132,8	10,39	8,6	8468	91.2
2,45	1116,5	127,8	8,74	10,2	8198	87.9
2,35	1021,3	135,7	7,53	11,9	7862	85.0
2,26	924,2	144	6,42	14,0	7707	83.1
2,18	812,9	155,9	5,21	16,4	5338	57.7
Total	2547,4	157,8	16,14	6,1	83228	88.9

b) Complexe binaire II

Résolution (Å)	Intensité moyenne	Sigma moyen	$\langle I/\sigma(I) \rangle$	R _{merge} (%)	Nombre de Réflexions	Complétude
4,3	19440	681,4	28,53	4,8	7408	99,8
3,51	19535	796,5	24,53	5,8	7341	99,9
3,09	12406	660,2	18,79	7,2	7327	99,9
2,82	6788,2	496,8	13,66	9,4	7314	99,9
2,63	4433,8	454,3	9,76	12,0	7305	99,9
2,48	3347,8	446,6	7,50	14,6	7270	99,9
2,36	2707,1	456,2	5,93	18,0	7257	99,8
2,26	2420,1	472,5	5,12	20,6	7265	99,8
2,17	2051,6	489,9	4,19	24,1	7288	99,6
2,1	1703,8	497,5	3,42	28,0	5443	75,1
Total	7668,7	546,9	14,02	8,5	71218	97,4

c) Complexe ternaire I

Résolution (Å)	Intensité moyenne	Sigma moyen	$\langle I/\sigma(I) \rangle$	R _{merge} (%)	Nombre de Réflexions	Complétude
4,7	2848,5	110,7	25,73	3,2	8583	89,8
3,73	3507,4	113,2	30,98	3,2	8580	93,7
3,26	2285,9	110,5	20,69	4,4	8634	94,3
2,96	1340,4	101,1	13,26	6,4	8613	95,2
2,75	851,1	94,9	8,97	9,4	8687	96
2,58	631,5	85,5	7,39	12,9	8782	97
2,46	501,9	91,3	5,50	16,7	8824	98
2,35	423,9	90,4	4,69	20,0	8832	98,4
2,26	386,4	90,6	4,26	23,4	8876	98,6
2,18	336	92	3,65	28,6	8377	93,8
Total	1304,1	97,9	13,32	6,5	86788	95,4

d) Complexe ternaire II

Résolution (Å)	Intensité moyenne	Sigma moyen	$\langle I/\sigma(I) \rangle$	R _{merge} (%)	Nombre de Réflexions	Complétude
4,32	11704,5	543,6	21,53	7,5	8479	97,8
3,43	11920,9	596,6	19,98	7,5	8394	98,3
2,99	7080,1	415,7	17,03	7,9	8311	97,6
2,72	3987,7	323,1	12,34	9,7	8254	97
2,52	2837,8	311,1	9,12	12,5	8158	96,3
2,38	2290,5	318,3	7,20	15,7	8093	95,8
2,26	2091,2	332,4	6,29	18,1	8100	95,3
2,16	1809,7	342,4	5,29	21,1	8003	94,8
2,07	1476,1	351,5	4,20	25,6	7973	94,3
2,00	1114,5	345,9	3,22	32,5	7378	87,3
Total	4734,4	389,9	12,14	10,5	81143	95,5

PHASAGE

Il n'a pas été possible d'utiliser directement les coordonnées de la structure de l'enzyme de type sauvage pour affiner les structures des mutants C149A et C149S, car ceux-ci cristallisent dans des nouvelles formes.

En supposant que les structures tridimensionnelles des mutants soient voisines de celles de type sauvage, la difficulté dans ce cas de figure était de déterminer les nouveaux empilements cristallins. La méthode du remplacement moléculaire, qui se déroule en deux étapes, est une méthode de choix pour résoudre ce type de problème. D'une part, le calcul de la fonction de rotation a pour but de trouver l'orientation du modèle, d'autre part, le calcul de la fonction de translation permet de positionner le modèle orienté dans la maille.

Cette méthode de remplacement moléculaire nous a permis, tout d'abord de valider les groupes d'espace des deux nouvelles formes cristallines ($P3_121$ pour le mutant C149A et $C2$ pour le mutant C149S).

1. Application du remplacement moléculaire à la forme hexagonale

Le modèle utilisé pour résoudre la structure du mutant C149A (forme BI) est celui de la GAPDH de type sauvage de *Bacillus stearothermophilus* sous forme holo, déposé dans la PDB (code PDB : *1gd1*). De cette enzyme modèle, nous avons soustrait le cofacteur NAD^+ , les ions sulfate et les molécules d'eau. Le programme *AMoRe* (Navaza, 1994) a ensuite été utilisé pour la recherche des fonctions de rotation et de translation, en utilisant l'intervalle de résolution entre 10 et 5 Å.

1.1. Fonction de rotation croisée

Dans un premier temps, le tétramère est placé dans une maille primitive et triclinique ($P1$) de dimension $97.5 \times 91.2 \times 81.1 \text{ \AA}^3$. La fonction de rotation rapide (Crowther, 1972) a été utilisée avec différents rayons d'intégration et par pas de $2,5^\circ$. Seuls les pics possédant une hauteur relative supérieure à 0,5 fois la hauteur relative maximale sont retenus.

1.2. Fonction de translation

Le centre de masse de chaque molécule dans une orientation donnée a été placé à l'origine d'une maille $P1$ de dimensions égales à celles de la maille contenant la structure inconnue. La fonction de Crowther et Blow (Crowther & Blow, 1967) implantée dans la procédure *TRAINING* de *AMoRe* a été utilisée. La recherche a été effectuée pour chaque pic de

la fonction de rotation en testant différentes orientations autour de ces solutions par variation des angles d'Euler par pas de 3°.

1.3. Affinement en corps rigide

Un affinement en corps rigide (Castellano *et al.*, 1992) a permis d'affiner simultanément les fonctions de rotation et de translation. La solution finale est obtenue avec un coefficient de corrélation de 69% et un indice résiduel de 32,4%. Les matrices de rotation et de translation, permettant de transformer les coordonnées du modèle initial (l'enzyme de type sauvage) dans la maille hexagonale, sont reportées dans le tableau V-9. Les caractéristiques du nouvel empilement cristallin seront discutées dans le chapitre Analyse et Discussion (chapitre VI-§ 1).

Tableau V-9 : Matrice de transformation des coordonnées du modèle initial dans la maille hexagonale.

<i>Rotation</i>			<i>Translation</i>
-0.02570	-0.69980	0.71388	42,9
-0.77139	-0.44033	-0.45942	58,5
0.63585	-0.56248	-0.52850	47,8

2. Application du remplacement moléculaire à la forme monoclinique

De même que pour la structure du mutant C149A, la structure de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski *et al.*, 1987) a été utilisée comme modèle de départ pour résoudre la structure du mutant C149S. Les molécules d'eau et le cofacteur NAD⁺ ont été retirés pour le remplacement moléculaire. Le logiciel *AMoRe* (Navaza, 1994) a été utilisé pour la détermination des phases des facteurs de structures du mutant C149S.

Compte tenu du volume de la maille des cristaux du mutant C149S, la solution la plus logique était de trouver un tétramère dans l'unité asymétrique. Malheureusement, le remplacement moléculaire en prenant le tétramère de l'enzyme de type sauvage comme modèle de départ n'a pas donné de solution correcte. Seule la possibilité où le monomère est pris comme modèle de départ pour le calcul de la fonction de rotation rapide a donné un résultat satisfaisant. En effet, ce calcul a permis de mettre en évidence 4 solutions se

dégageant des 46 autres. Quatre calculs de la fonction de translation ont permis de trouver la solution finale avec un bon coefficient de corrélation de 70,8 % et un indice résiduel de 29,8 %. Les quatre matrices de rotation et de translation, permettant de transformer les coordonnées du modèle initial (un monomère de l'enzyme de type sauvage) dans la maille monoclinique, sont reportées dans le tableau V-10.

La solution du remplacement moléculaire est ensuite visualisée grâce un programme Turbo Frodo (Roussel & Cambillau, 1989). A partir de ces quatre monomères, il a été possible de construire deux dimères dans l'unité asymétrique (figure V-5).

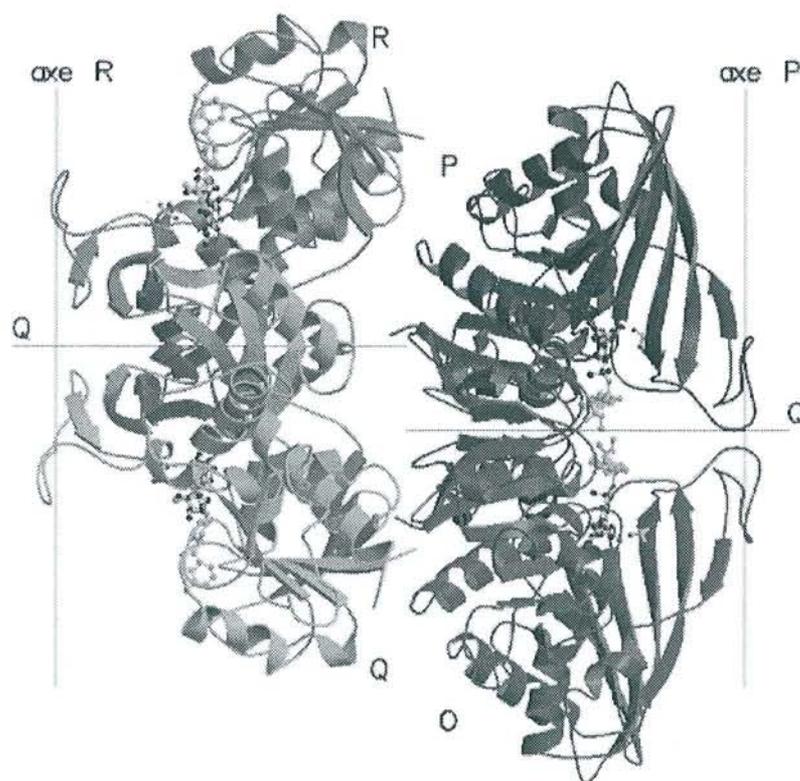


Figure V- 5 : Représentation en ruban des deux dimères du complexe binaire II dans l'unité asymétrique de la maille monoclinique.

Tableau V- 10 : Matrice de transformation des coordonnées du modèle initial (monomère O) dans la maille monoclinique.

	<i>Rotations</i>			<i>Translations</i>
Monomère 1	-0,00034	-0,74721	0,66459	0,01
	-1	0,0006	0,00015	15,2
	-0,00051	-0,66459	-0,74721	0,16
Monomère 2	-0,69872	-0,71537	0,00533	41,27
	-0,01508	0,00728	-0,99986	23,44
	0,71523	-0,69871	-0,01588	52,39
Monomère 3	-0,00506	-0,72376	-0,69004	70,38
	0,99993	0,00401	-0,01154	59,01
	0,01112	-0,69004	0,72368	-0,16
Monomère 4	0,69459	-0,7183	-0,0399	41,15
	-0,00433	-0,05963	0,99821	23,11
	-0,71939	-0,69318	-0,04453	52,69

Ces deux dimères appartiennent à deux tétramères différents “reconstruits” en utilisant l’axe binaire cristallographique du groupe C2. Chaque tétramère a donc un de ces axes binaires (P ou R) confondu avec l’axe binaire cristallographique. Pour l’un, l’axe R est l’axe binaire cristallographique et pour l’autre, l’axe P. Les monomères seront notés *O* et *Q* pour le dimère du tétramère *T1* et *P'* et *R'* pour le dimère du tétramère *T2*. La nature de cet empilement cristallin est particulière et sa comparaison avec les empilements des autres GAPDH cristallisées sera discutée dans le chapitre VI.

Affinement des modèles

1. Introduction

La méthode de remplacement moléculaire permet d'obtenir les phases des facteurs de structure qui correspondent au modèle introduit dans la maille cristalline. La carte de densité électronique construite à partir de ces facteurs de structure est imprécise car elle contient de nombreuses erreurs.

Les études présentées dans cette thèse concernent des résolutions structurales des mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* cristallisant dans des systèmes différents de celui de l'enzyme de type sauvage. Par conséquent, des différences par rapport à la structure de cette enzyme sont attendues, principalement autour de la ou des zones de mutation et au niveau des résidus impliqués dans l'empilement cristallin.

L'étape d'affinement est ainsi indispensable pour construire un modèle complet aussi proche que possible des données expérimentales. Cet affinement est guidé par l'accord qui existe entre les facteurs de structure calculés à partir du modèle (F_c) et les facteurs de structure observés (F_o).

Pour une détermination de la structure cristalline, des étapes graphiques de construction ou de reconstruction du modèle s'intercalent entre des étapes de calcul. Pour les étapes graphiques, différents types de cartes de densité électronique sont calculés, puis visualisés sur un terminal graphique. Ces cartes permettent de vérifier systématiquement le modèle, de compléter les zones incomplètes et de modifier les zones erronées.

2. Affinement des complexes binaire I et ternaire I

2.1. Complexe binaire I (C149A + NAD⁺)

Le modèle de départ utilisé pour l'affinement de la structure du complexe binaire I est celui de la GAPDH de type sauvage de *B. stearothermophilus* sous forme holo, déposé dans la PDB (code PDB : *1gd1*). De cette structure modèle, il a été ôté le cofacteur NAD⁺, les ions sulfate et les molécules d'eau. Le résidu Cys149, de l'enzyme de type sauvage de *B. stearothermophilus*, a été remplacé par le résidu Ala.

La solution de remplacement moléculaire a été introduite dans la chaîne de programmes X-PLOR, où un affinement en corps rigide a été effectué: le facteur R a chuté à

35,6 % (R_{free} de 34,2 %) entre 8 et 2,2 Å. Ceci a permis de préciser la position et l'orientation du tétramère dans l'unité asymétrique.

Un affinement de 100 cycles de minimisation d'énergie par la méthode de gradient conjugué a permis d'affiner les positions atomiques du modèle. A la suite de cet affinement une carte de densité différence ($F_o - F_c$) a été calculée. Cette dernière nous a permis de vérifier la mutation Cys149 en Ala149.

Il a aussi été possible de vérifier la présence du cofacteur NAD^+ dans les quatre monomères. La conformation initiale du cofacteur, introduite dans la structure du complexe binaire I, est celle observée dans l'enzyme de type sauvage. La figure V-6 montre le cofacteur NAD modélisé dans la densité électronique. En ce qui concerne les sites anioniques, un large pic de densité électronique (contour supérieur à 5σ) est observé dans le site Ps alors que le site Pi est vide (figure V-7). Ce pic dans le site Ps, attribué à un anion sulfate, est inattendu car la solution de cristallisation (protéine, agent précipitant et tampon) est exempte de sulfate. Ce sulfate provient probablement des conditions de purification qui comporte une étape de précipitation au sulfate d'ammonium. Un cycle d'affinement suivi d'un calcul d'une carte différence de densité électronique ($F_o - F_c$) a confirmé la présence de cet anion sulfate dans le site Ps. En effet la carte différence ne présente pas de contour négatif autour du modèle de l'anion sulfate. Dans le voisinage du site Pi, un pic de densité électronique de faible contour (autour de $3,5\sigma$) a été observé. Ce dernier a été attribué à une molécule d'eau (figure V-7).

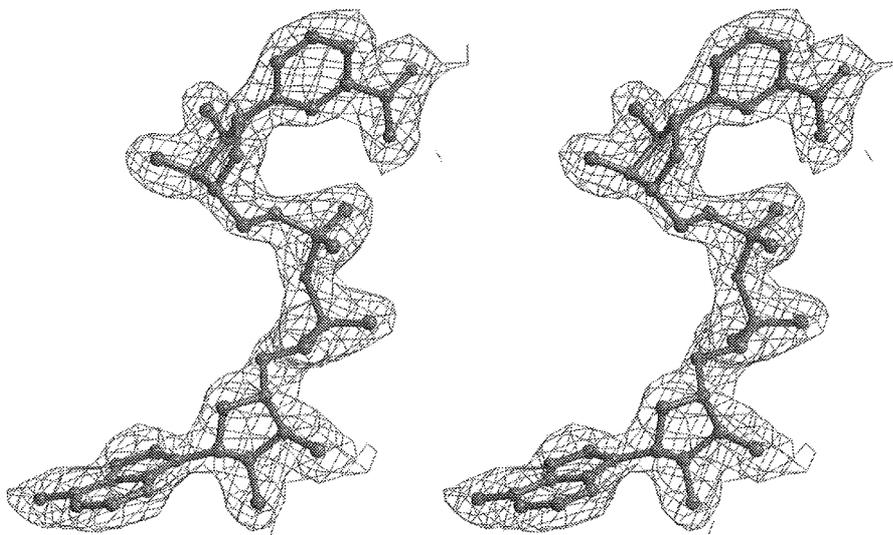


Figure V- 6 : Densité électronique du NAD du monomère O du mutant C149A. Carte de densité électronique de type ($2F_o - F_c$), niveau de contour $1,2 \sigma$.

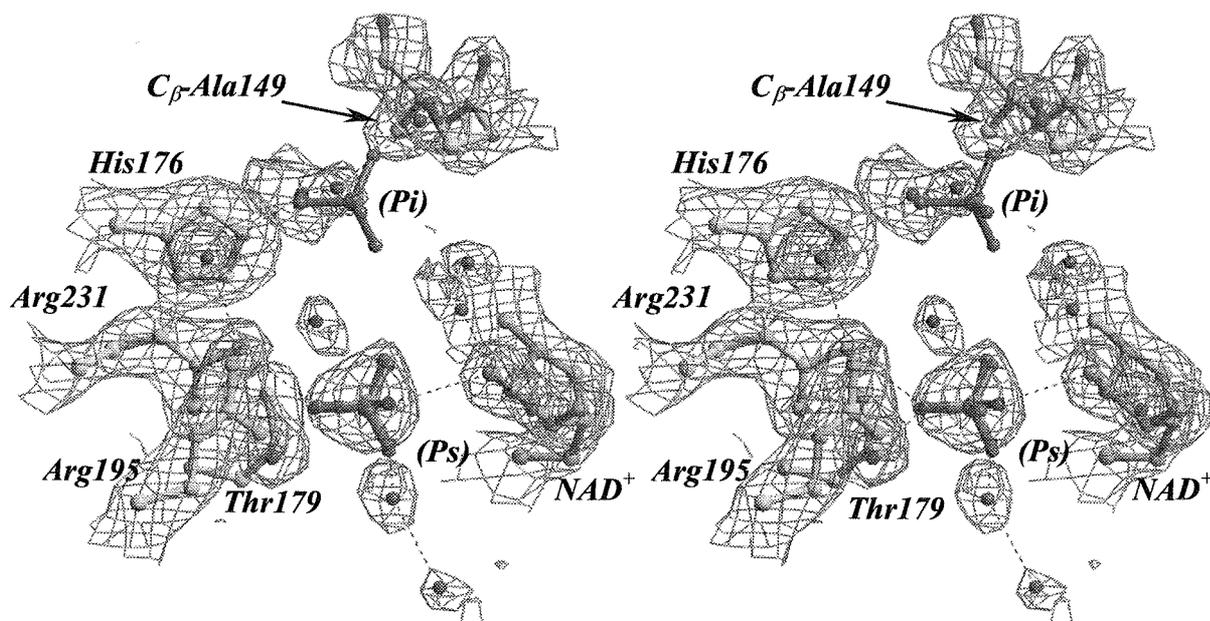


Figure V- 7 : *Vue stéréoscopique du site actif du mutant C149A dans la densité électronique de type (2Fo – Fc), niveau de contour : 1,2 σ . Dans le site Ps le modèle du sulfate est bien entouré par la densité. Le site Pi est libre de tout anion. Le modèle du sulfate (en rose) est introduit ici pour montrer la position de ce site.*

A ce stade, la procédure du recuit simulé (Brünger *et al.*, 1997) a été utilisée pour essayer de perturber la structure de l'holoenzyme, afin d'observer les changements structuraux éventuels induits par la mutation ou le nouvel empilement cristallin. Cette procédure d'affinement se décompose en quatre phases : la première étape consiste à évaluer le poids W_a permettant d'équilibrer le gradient de l'énergie cristallographique avec celui de l'énergie moléculaire. Durant la deuxième étape, un affinement par gradient conjugué est réalisé dans le but d'éliminer les mauvais contacts non liés qui pourrait poser problème au départ de la dynamique moléculaire. Le modèle ainsi "préparé" subit alors un recuit simulé avec pour température initiale 2000 K et finale 300 K. Le refroidissement est réalisé par sauts de 50 K toutes les 25 fs avec une incrémentation de temps de 0,5 fs. Cette procédure se termine par un affinement de 100 cycles des positions atomiques. Cet affinement a fait chuter le facteur R à 25,3 % (R_{free} de 31 %). A ce stade, il a été possible de calculer les cartes de densité électronique (2Fo-Fc) et (Fo-Fc).

La carte de densité électronique ne révélait pas de désaccord avec le modèle, seule la boucle 206-210 a dû être reconstruite manuellement.

A partir de la carte résiduelle, il a été possible de modéliser les molécules d'eau pour les pics de densité supérieurs à 3,5 σ . Seules les molécules susceptibles de former au moins

une liaison hydrogène avec la protéine ont été prises en compte. Après chaque étape de constructions manuelles, un nouvel affinement des positions, puis des facteurs B_i a été effectué. Toutes les molécules d'eau ont été vérifiées avec le système graphique. Elles ont été conservées si leur contour était supérieur à 1σ dans la carte de densité ($2Fo-Fc$) et si elles permettaient la formation d'au moins une liaison hydrogène avec un atome de la protéine ou d'une autre molécule de solvant. Après plusieurs cycles de minimisation sur l'ensemble des positions atomiques et des facteurs de température individuels, les molécules d'eau présentant un facteur de température supérieur à 60 \AA^2 ont été retirées de l'affinement. Cette procédure a permis une construction progressive des molécules d'eau.

Le facteur final R est de 17,6 % (R_{free} de 21,5 %) entre 8 et 2,2 Å; le facteur de température moyen du modèle est de 10.47 \AA^2 ($9,44 \text{ \AA}^2$ pour la chaîne principale, $6,75 \text{ \AA}^2$ pour le cofacteur et $12,78 \text{ \AA}^2$ pour les molécules d'eau). Le tableau V-11 présente les caractéristiques du modèle en fin d'affinement du complexe binaire I.

Tableau V- 11 : Caractéristiques des affinements des complexes binaire I et ternaire I

	Complexe binaire I	Complexe ternaire I
Résolution (Å)	8-2,2	8-2,2
Réflexions ($F > 2\sigma(F)$)	86905	86696
Facteur R (%)	17,6	17,7
Facteur R_{free} (%)	21,5	22
Facteur d'agitation thermique moyen pour la chaîne principale	9.44 \AA^2	10.69 \AA^2
Facteur de température moyen global	14.73 \AA^2	21.63 \AA^2
Nombre de molécules d'eau	1067	1060

2. 2. Complexe ternaire I (C149A + NAD⁺ + G3P)

Le complexe ternaire I a été affiné à partir du modèle final du complexe binaire I duquel ont été soustraites les molécules d'eau, le sulfate en Ps et le cofacteur NAD. Un premier affinement en corps rigide, sur l'ensemble du tétramère, a fait chuter le facteur R à 28 % (R_{free} de 27,9 %) entre 8 et 2,2 Å.

Quatre affinements de 100 de cycles de minimisation d'énergie par la méthode de gradient conjugué ont été utilisés afin d'affiner les positions atomiques du modèle. A la suite

de ces affinements, une carte de densité différence ($F_o - F_c$) a été calculée. Cette dernière nous a permis de modéliser les quatre molécules de NAD.

Au niveau du site actif, la carte de densité électronique révèle un large pic de densité dans le site Ps qui s'étend dans la direction de l'acide aminé Ala149. Ce pic est supposé être le pic de densité électronique du substrat G3P diffusé dans le cristal. Le site Pi est vide. Cependant, pour s'en assurer, cinq cycles d'affinement ont été effectués tout en ajoutant après chaque cycle 50 molécules d'eau par monomère. Les facteurs R et R_{free} à la fin de ces affinements sont de respectivement 20,5 % et 25,5 %, ce qui nous a permis d'obtenir des cartes de densité électroniques ($F_o - F_c$) et ($2F_o - F_c$) de bonne qualité.

La carte différence $F_o - F_c$ a montré clairement que le large pic de densité s'est intensifié. Ce dernier est beaucoup plus fort pour le monomère O que dans le cas des monomères P, Q et R. Un modèle de l'énantiomère D du G3P a pu être construit dans chaque monomère, sans ambiguïté. Le modèle de départ du G3P est celui obtenu à partir de la résolution structurale par diffraction X du composé Disodium D-3-Phosphoglycerate (Lis & Jerzykiewicz, 1996). La conformation du substrat a alors été ajustée d'une part en fonction de la densité électronique et d'autre part en tenant compte des interactions avec les groupements voisins (figure V-8).

Avant de prendre en compte le substrat D-G3P dans l'affinement, il a fallu créer des dictionnaires de paramètres à l'aide du programme XPLO2D (Kleywegt & Jones, 1997). Plusieurs cycles d'affinement ont été réalisés par la suite entre 8 et 2.2 Å, à partir des 86 696 réflexions. Les principales caractéristiques cristallographiques de l'affinement sont données dans le tableau V-11 (§ 3.1).

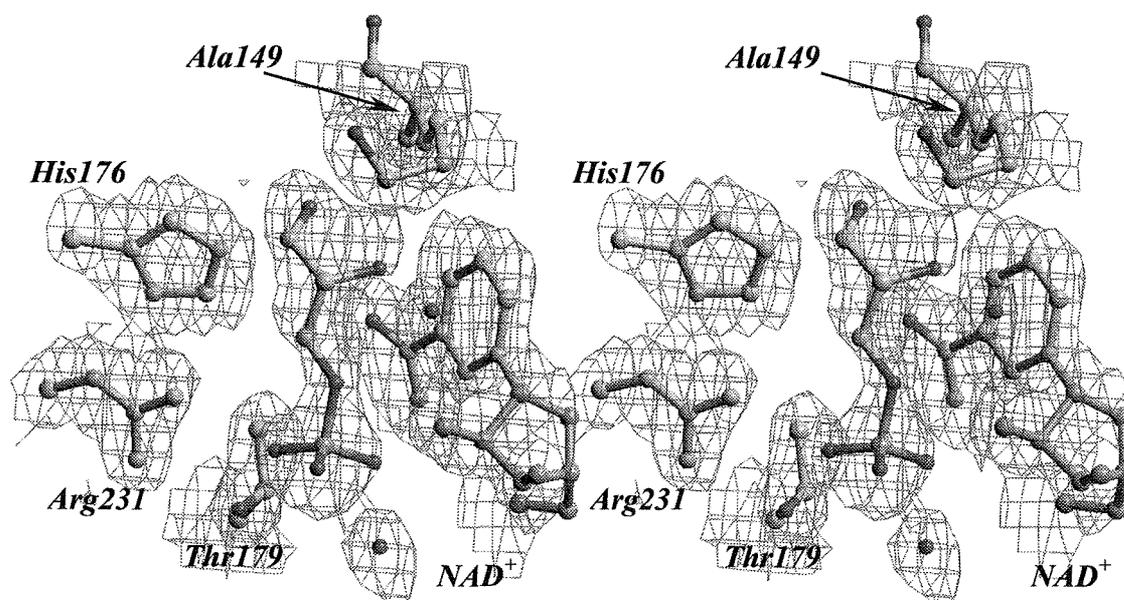


Figure V- 8 : vue stéréographique de la densité électronique du site actif. Le modèle du D-G3P est présenté dans la figure. La carte de densité électronique est de type 2Fo-Fc, niveau de contour 1,5 σ .

3. Affinement des complexes binaire II et ternaire II

3. 1. Complexe binaire II (C149S + NAD⁺)

Les deux dimères dans l'unité asymétrique, générés par le remplacement moléculaire, à partir de la structure de l'enzyme de type sauvage, ont été introduits comme modèles pour l'affinement de la structure du complexe binaire II. Le résidu Cys149 de l'enzyme de type sauvage de *B. stearothermophilus*, a été remplacé par le résidu sérine.

La procédure d'affinement du complexe binaire II est identique à celle utilisée pour le complexe binaire I (voir § 3.1). Aucune reconstruction majeure n'a dû être réalisée dans la densité électronique. Comme dans le cas du complexe binaire I, un anion sulfate a dû être modélisé dans le site anionique du substrat (site Ps) (figure V-9). Les résultats finaux des affinements sont données dans le tableau V-12.

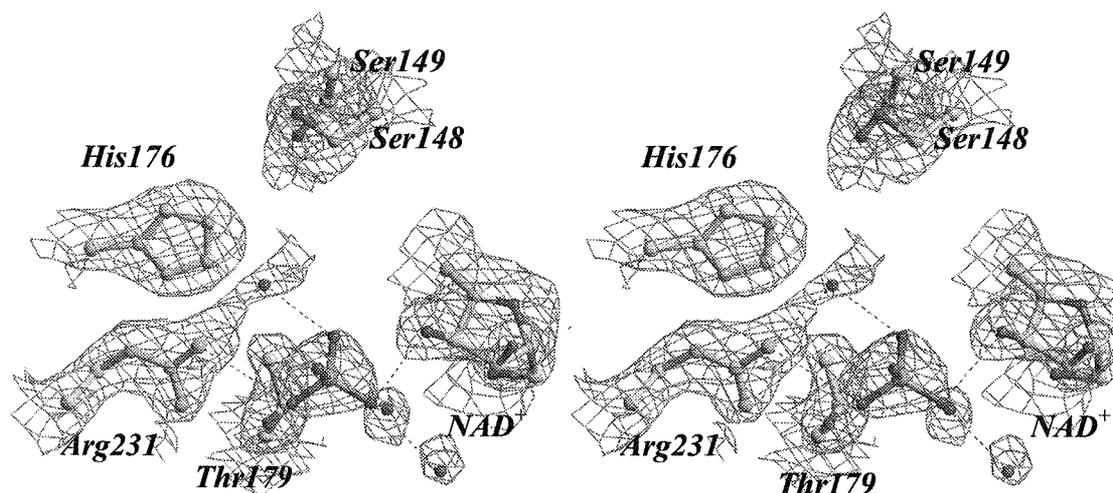


Figure V- 9: vue stéréographique du site actif du mutant C149S dans la densité électronique de type $(2F_o - F_c)$, niveau de contour : $1,2 \sigma$. Dans le site Ps, le modèle du sulfate est bien entouré par la densité. Le site Pi est libre. Le modèle du sulfate est introduit ici pour montrer la position de ce site

Tableau V- 12 : récapitulatif des caractéristiques cristallographiques des structures des complexes binaire et ternaire II.

	Complexe binaire II	Complexe ternaire II
Résolution (Å)	8-2,12 Å	8-2,12 Å
Réflexions ($F > 2\sigma(F)$)	71217	78775
Facteur R	20,45	18,3
Facteur R_{free}	26,83	24,7
Facteur d'agitation thermique moyen pour la chaîne principale	12.34 Å ²	19.71 Å ²
Facteur de température moyen global	13.60 Å ²	20.92 Å ²
Nombre de molécules d'eau	642	690

3. 2. Complexe ternaire II

Ce complexe ternaire a été affiné à partir du modèle final du complexe binaire II. Le même protocole d'affinement du complexe ternaire I est appliqué pour affiner les positions

des atomes du modèle. La présence du D-G3P dans le site actif a été mise en évidence par une densité correspondante au substrat, dans la carte de densité résiduelle ($F_o - F_c$). Les quatre molécules du substrat D-G3P ont donc été ajoutées au modèle (figure V-10). Les dictionnaires de paramètres et topologies, précédemment préparés pour le complexe ternaire I, ont été utilisés pour les affinements du modèle avec le substrat. Les principales caractéristiques cristallographiques de l'affinement sont données dans le tableau V-12.

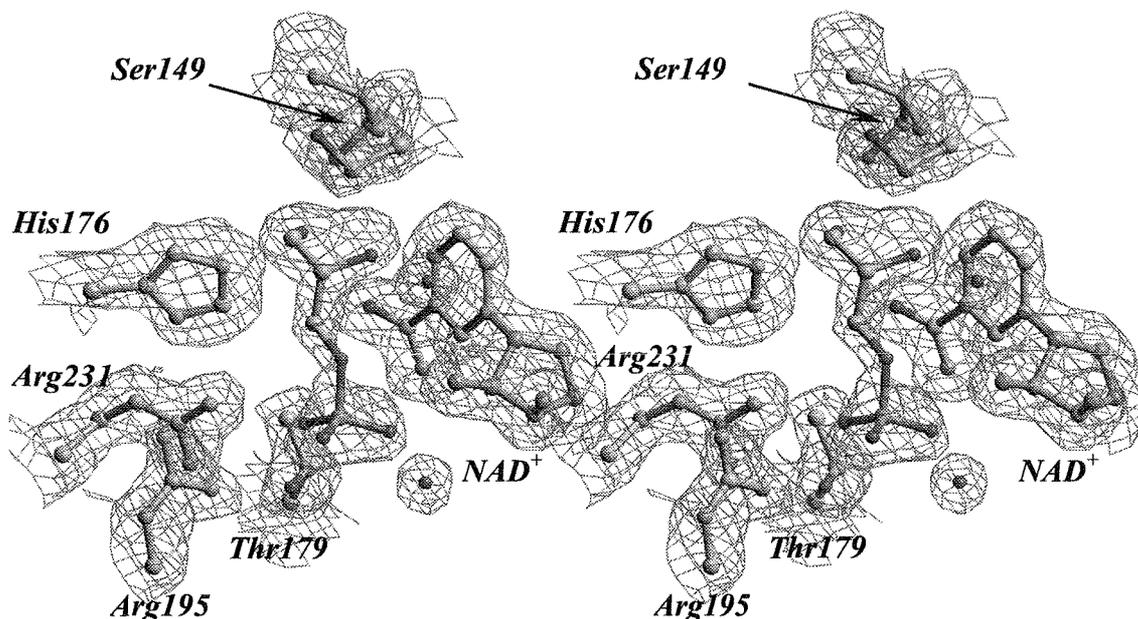


Figure V- 10 : Vue stéréoscopique du site actif du complexe ternaire II dans la densité électronique de type ($2F_o - F_c$), niveau de contour : $1,2 \sigma$. Le substrat D-G3P est dans le site actif avec son phosphate en C_3 dans le site Ps.

4. Qualité de l'affinement

4. 1. Densité électronique

Avec les quatre sous-unités dans l'unité asymétrique du cristal, la présence de pics équivalents dans les cartes de densité électronique nous a fourni des informations qui nous ont permis de minimiser le niveau des erreurs systématiques dans les coordonnées du modèle affiné. La carte finale ne contient aucune zone non interprétable. Tous les atomes de la chaîne principale ont leur densité électronique correspondante dans la carte de densité finale, calculée avec les coefficients de Fourier ($2F_{obs} - F_{calc}$). La haute qualité de cette carte nous a permis d'interpréter clairement les détails de la structure. Par exemple, les chaînes latérales chargées (Lys62, Glu80, Glu103 et Lys192), qui n'étaient que très faiblement résolues dans la structure

de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987), présentent des densités électroniques bien définies dans nos structures. De plus, les résidus Lys45, Lys101 et Glu220, présentant plusieurs conformations dans la structure de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) présentent des densités électroniques et des directions bien caractéristiques dans nos structures des complexes binaires I et II.

4. 2. Le diagramme de Ramachandran

La qualité des données stéréochimiques du modèle a été estimée avec le programme PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Ce programme permet, entre autres, de tracer les diagrammes de Ramachandran. Ce diagramme permet d'estimer la qualité de la construction de la chaîne principale par rapport aux angles dièdres, ϕ autour de la liaison N-C α et ψ autour de la liaison C α -C (Ramakrishnan *et al.*, 1965).

La figure V-11 représente les diagrammes de Ramachandran des deux monomères O et P de chacune des structures des complexes ternaire I et binaire I. La figure V-12 représente les diagrammes de Ramachandran des deux monomères O et Q de chacune des structures des complexes ternaire II et binaire II. Tous les résidus sont situés dans une zone de conformation favorable à l'exception de certains résidus non-glycine (Ala147, Asp186 et Val237), placés à l'extérieur des bordures des régions permises. Ces résidus ont été localisés à l'extérieur de la région permise dans d'autres structures de GAPDH (Duée et al., 1996). Ces résidus sont tous localisés sur des boucles et leurs densités électroniques correspondantes sont bien définies dans les cartes de différences de Fourier ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$).

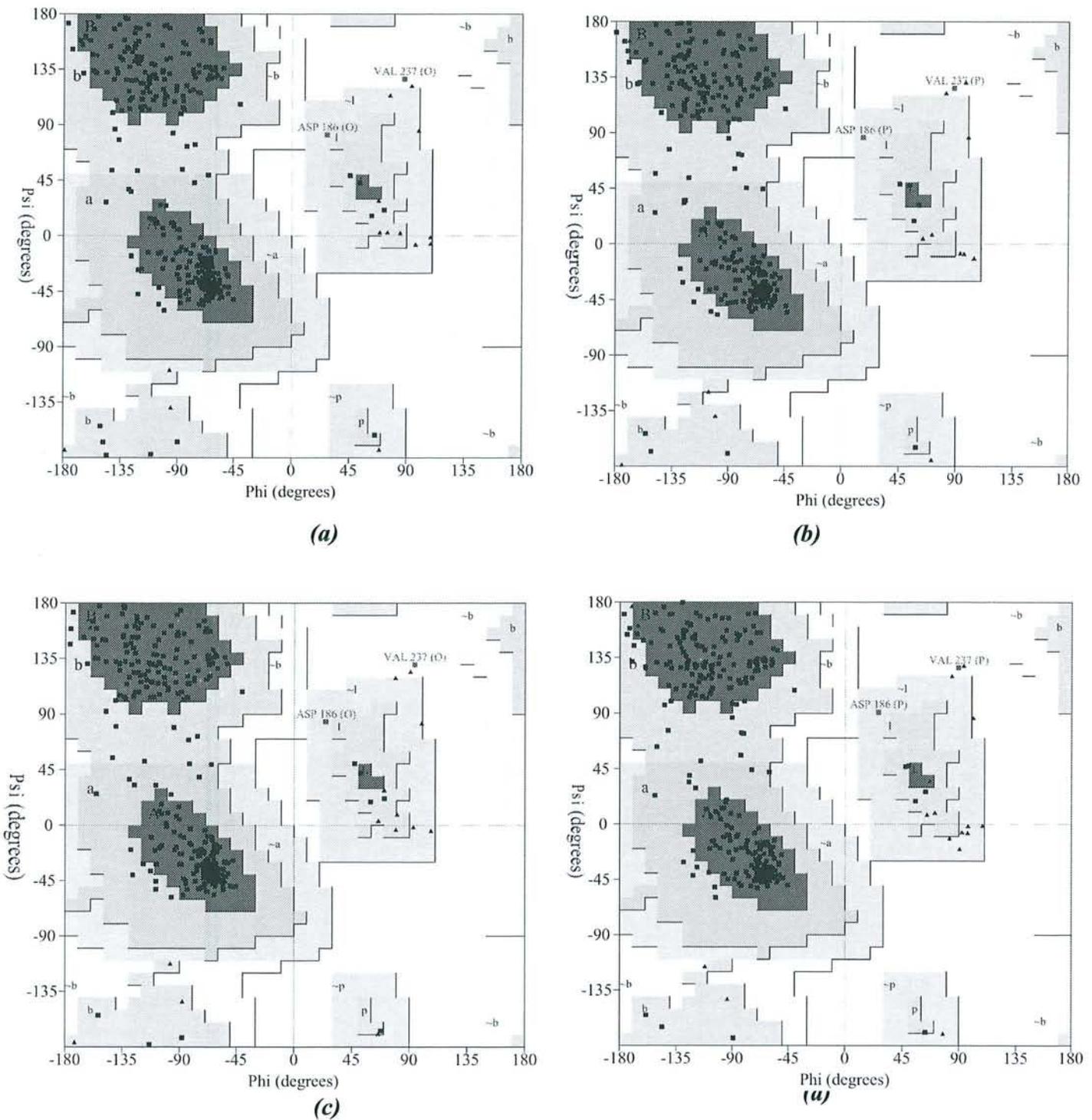


Figure V- 11 : Diagrammes de Ramachandran du complexe binaire I (en haut) et du complexe ternaire I (en bas), pour les monomères O (a, c) et les monomères P (b, d).

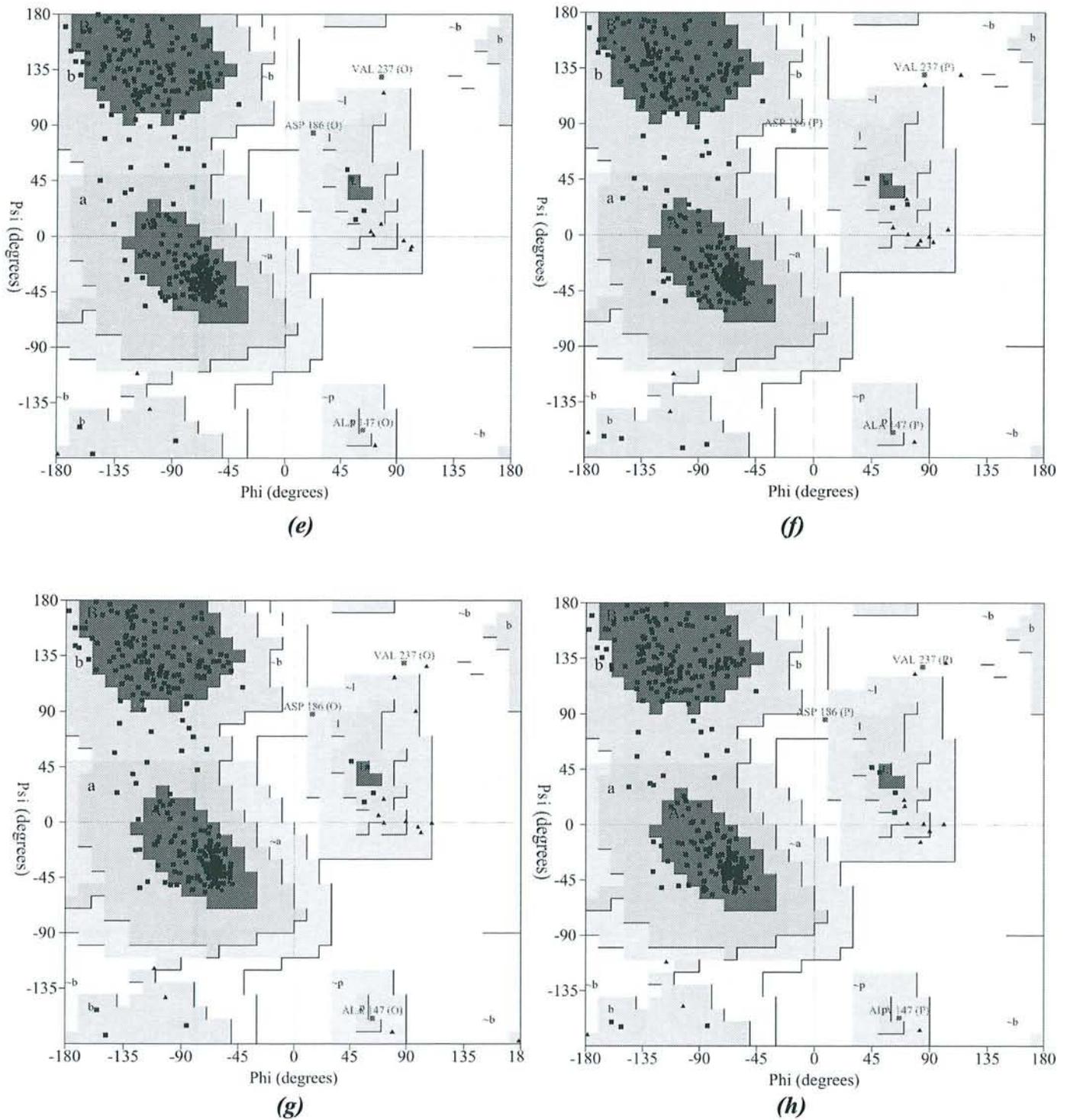


Figure V- 12 : Diagrammes de Ramachandran du complexe binaire II (en haut) et du complexe ternaire II (en bas), pour les monomères O (e, f) et les monomères Q (g, h).

Chapitre VI

ANALYSE ET DISCUSSION

Chapitre VI : Analyse et Discussion

1. Introduction

Dans ce chapitre nous tentons de mettre en évidence les propriétés catalytiques de la GAPDH à partir des caractéristiques structurales des quatre structures résolues : deux complexes binaires et deux complexes ternaires. Dans un premier temps, nous analyserons les nouveaux empilements cristallins obtenus à partir de nos conditions de cristallisation. Les structures tridimensionnelles des deux complexes binaires et des deux complexes ternaires seront analysées et comparées avec celles précédemment résolues. Par la suite, nous décrirons les modèles des complexes ternaires.

2. Analyse de l'empilement cristallin

2.1. Forme hexagonale

L'empilement cristallin des molécules du mutant C149A cristallisé à pH 4,6 est illustré sur la figure VI-1. Chaque tétramère est en contact avec 6 voisins, formant au total 6 interfaces tétramère-tétramère symétriques deux à deux. Les monomères sont situés dans des environnements cristallins différents dans l'unité asymétrique. Les 6 positions équivalentes du groupe d'espace $P3_121$ sont représentées sur la figure VI-1.

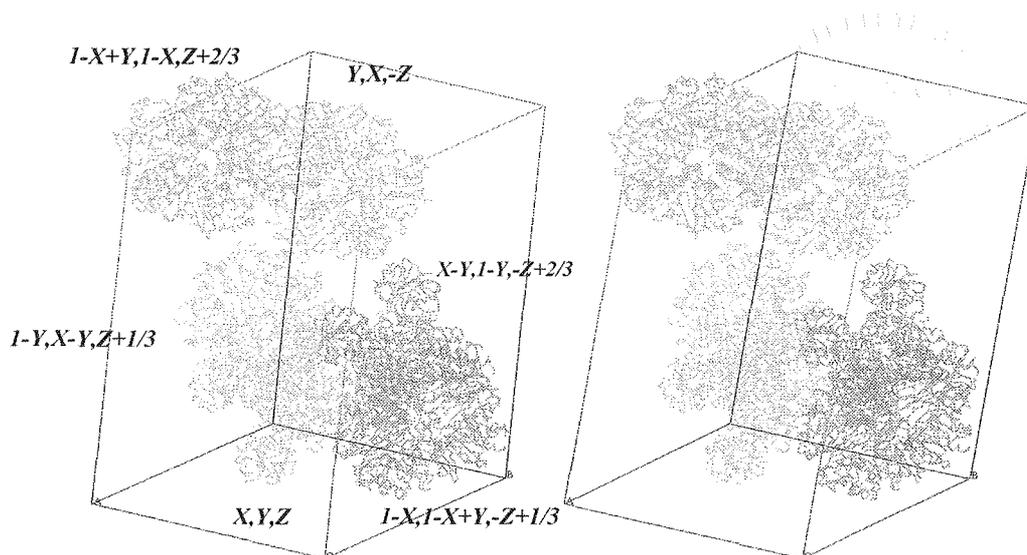


Figure VI-1 : Vue stéréoscopique de l'empilement cristallin des molécules du mutant C149A cristallisées à pH 4,6.

Cet empilement cristallin engage huit liaisons hydrogène entre les tétramères, impliquant six atomes du monomère O, sept atomes du monomère P et trois atomes du monomère R. Les distances des contacts intermoléculaires possibles entre les tétramères dans le réseau cristallin ont été calculées par le programme *X-PLOR* (Brünger, 1992). La validité de ces interactions a ensuite été vérifiée sur écran graphique à l'aide du programme TURBO-FRODO. Ces interactions sont représentées dans le tableau VI-1.

Tableau VI-1 : Les atomes impliqués dans des contacts intermoléculaires entre les tétramères dans le réseau cristallin du complexe binaire I (forme hexagonale).

Tétramère de référence	Tétramère voisin	Distance de liaison(Å)	Localisation	Position équivalente
N -GLU 249 (O) ...	OE2 -GLU 110 (R)	3.02	$\alpha 3/\alpha E$	$-x, x-y, 1/2+z$
OE2 -GLU 253 (P) ...	NZ -LYS 260 (R)	3.12	$\alpha 3/\alpha 3$	$-x, y-x, 1/3-z$
NZ -LYS 260 (P) ...	OE2 -GLU 253 (R)	3.29	$\alpha 3/\alpha 3$	$-x, y-x, 1/3-z$
O -GLU 264 (O) ...	NH2 -ARG 102 (P)	2.91	$\alpha 3/\alpha E$	$x-y, -y, 2/3-z$
O -GLY 265 (O) ...	NE -ARG 102 (P)	2.82	$\alpha 3-\beta 5/\alpha E$	$x-y, -y, 2/3-z$
O -GLY 265 (O) ...	NH2 -ARG 102 (P)	2.94	$\alpha 3-\beta 5/\alpha E$	$x-y, -y, 2/3-z$
NZ -LYS 268 (O) ...	O -ALA 140 (P)	2.64	$\alpha 3-\beta 5/\beta E-\beta F$	$x-y, -y, 2/3-z$
NZ -LYS 268 (O) ...	OD1 -ASP 125 (P)	3.39	$\alpha 3-\beta 5/\beta F-\beta G$	$x-y, -y, 2/3-z$

La plupart de ces contacts sont formés par les atomes des sous-unités O et P. La carte de densité électronique des monomères, au niveau de la région où il existe des résidus formant ces contacts intermoléculaires, est très bien définie.

2.2. Forme monoclinique

Le changement de la condition de cristallisation pour l'enzyme mutée C149S a conduit à un nouvel empilement cristallin, différent à la fois des cristaux de la forme BI et de ceux de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987). L'empilement cristallin de l'enzyme mutée C149S est illustré sur la figure VI-2. Dans cette forme cristalline (forme BII), l'unité asymétrique est constituée de deux dimères O-Q et P'-R' issus de deux tétramères différents.

Les notations définissant les monomères des complexes binaire et ternaire II sont arbitraires. La position spatiale de chacun des monomères offrant plusieurs possibilités de définition selon les différents axes P, Q et R.

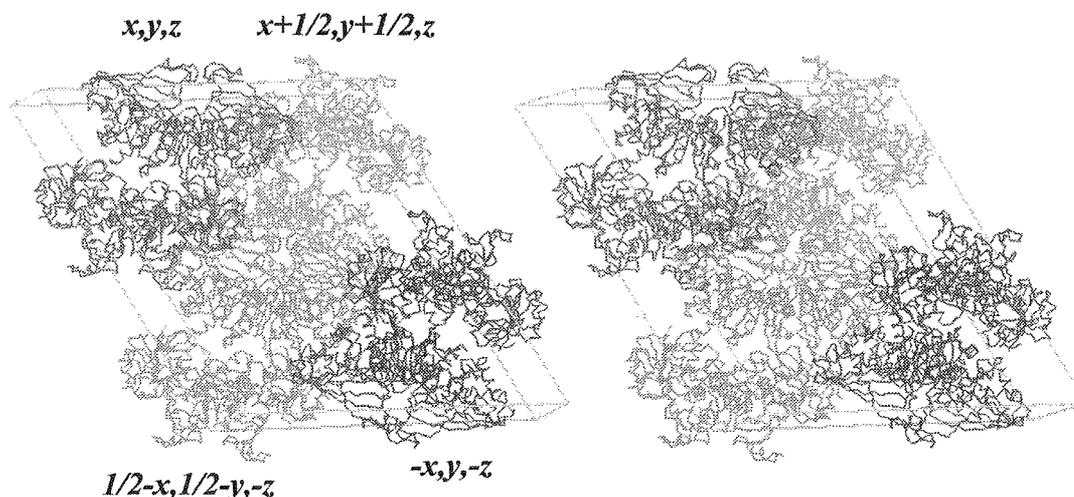


Figure VI-2 : Vue stéréoscopique de l'empilement cristallin des molécules du mutant C149S cristallisées à pH 7,5.

En effet, les axes binaires P du tétramère A et R du tétramère B sont confondus avec l'axe binaire cristallographique du groupe C2. Par conséquent, l'opération de symétrie $(-x, y, -z)$ génère le tétramère A à partir du dimère O-Q, de même, l'opération de symétrie $(1-x, y, 1-z)$ génère le tétramère B à partir du dimère P'-R'. La figure VI-3 illustre les deux dimères indépendants.

Le tableau VI-2 indique les contacts entre tétramères dans le réseau cristallin.

Tableau VI- 2 : Les atomes impliqués dans des contacts intermoléculaires dans le réseau cristallin de la forme monoclinique du mutant C149S.

<i>Dimère de référence</i>	<i>Dimère voisin</i>	<i>Distance de liaison(Å)</i>	<i>Localisation</i>	<i>Position équivalente</i>
OD1 -ASN 60 (P') ...	NZ -LYS 136 (R')	3.36	$\beta'/\beta F-\beta G$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
N -GLY 61 (O) ...	O -ASP 135 (O)	2.98	$\beta'-\beta''/\beta F-\beta G$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
OE1 -GLU 70 (O) ...	NZ -LYS 136 (O)	3.24	$\beta''-\beta C/\beta F-\beta G$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
OE2 -GLU 70 (O) ...	NZ -LYS 136 (O)	3.14	$\beta''-\beta C/\beta F-\beta G$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
OE1 -GLU 86 (Q) ...	NE -ARG 102 (R')	3.31	$\alpha D/\alpha E$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
OE1 -GLU 86 (Q) ...	NH2 -ARG 102 (R')	3.08	$\alpha D/\alpha E$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
OE2 -GLU 86 (Q) ...	NE -ARG 102 (R')	2.82	$\alpha D/\alpha E$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
ND2 -ASN 123 (O) ...	OE1 -GLU 275 (P')	3.00	$\beta E-\beta F/\beta 5$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
NZ -LYS 212 (O) ...	O -GLU 249 (P')	2.65	$\alpha 2/\beta 4-\alpha 3$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
NZ -LYS 212 (O) ...	OE1 -GLU 254 (P')	2.90	$\alpha 2/\alpha 3$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
NZ -LYS 222 (O) ...	O -GLN 164 (P')	3.31	$\alpha 2-\beta 3/\alpha 1$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
O -GLY 223 (O) ...	NZ -LYS 248 (Q)	2.79	$\alpha 2-\beta 3/\beta 4-\alpha 3$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
ND2 -ASN 226 (O) ...	OE1 -GLU 249 (Q)	3.43	$\beta 3/\beta 4-\alpha 3$	$-x+1/2, y+1/2, -z$
OE1 -GLU 247 (O) ...	NZ -LYS 303 (P)	3.17	$\beta 4-\alpha 3/\beta 6-\beta 7$	x, y, z
OE1 -GLU 253 (O) ...	NZ -LYS 303 (Q)	3.37	$\alpha 3/\beta 6-\beta 7$	$x+1/2, y+1/2, z$
OE2 -GLU 253 (O) ...	NZ -LYS 303 (Q)	3.29	$\alpha 3/\beta 6-\beta 7$	$x+1/2, y+1/2, z$
OE2 -GLU 253 (O) ...	NH2 -ARG 169 (R)	3.34	$\alpha 3/\alpha 1-\beta 1$	$-x+1/2, y+1/2, -z$

Remarque : Le nombre de contacts intermoléculaires est plus élevé que celui de la forme hexagonale (forme BI), ce qui montre la grande compacité de la maille (les paramètres de Matthews V_M sont de 2,92 Å³/Da et 2,19 Å³/Da pour les formes cristallines BI et BII respectivement). La présence de ces nombreuses interactions entre les molécules du cristal pourrait être à l'origine de la stabilité du réseau et expliquer ainsi la plus haute résolution obtenue pour ces cristaux par rapport à ceux de la forme hexagonale.

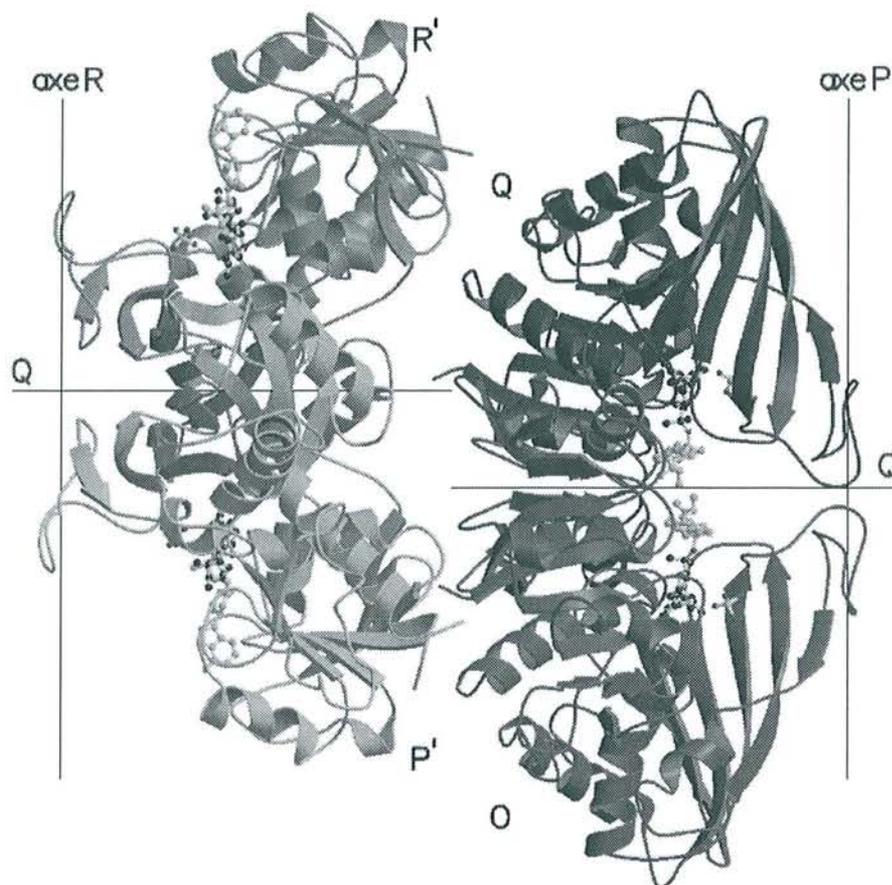


Figure VI-3 : Représentation en ruban des deux dimères du complexe binaire II dans l'unité asymétrique.

2.3. Etude comparative avec les GAPDH de structures connues

Depuis la première structure de GAPDH de homard résolue, quinze GAPDH différentes ont été cristallisées (Tableau VI-3) :

- Dix de ces structures sont déposées dans la banque de données structurales des protéines de Brookhaven PDB (Protein Data Bank) (Bernstein *et al.*, 1977).
- Cinq autres enzymes ont seulement fait l'objet d'études cristallographiques préliminaires, déterminant les paramètres de la maille, le groupe d'espace et le nombre de molécules par unité asymétrique : l'enzyme d'écrevisse (*Astacus*) (Campbell *et al.*, 1971) ; d'esturgeon (*Acipenser sturio*) (Holmes *et al.*, 1977) ; de langouste méditerranéenne (*Palinurus vulgaris*) (Berni *et al.*, 1979) ; de *Bacillus coagulans*

(Griffith *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1982) ; et du muscle de porc (*Sus scrofa*) (Devedjiev *et al.*, 1994). L'enzyme de *Methanothermus fervidus* cristallise dans le groupe d'espace C2 avec deux sous-unités par unité asymétrique (Fabry & Hensel, 1988). Cependant, seules les études préliminaires des paramètres de maille et la détermination du groupe d'espace ont été réalisées pour cette forme cristalline. Dans le tableau VI-3, c'est la forme cristalline orthorhombique (P2₁2₁2) de la GAPDH de *Methanothermus fervidus* qui est présentée (Charron *et al.*, 1999).

Toutes les GAPDH résolues présentent des structures tertiaires et quaternaires quasiment identiques. Les structures primaires et secondaires sont peu différentes, excepté pour les GAPDH d'archaes qui présentent des structures primaires et secondaires caractéristiques (Charron *et al.*, 1999; Isupov *et al.*, 1999).

Comparaison des empilements cristallins

L'analyse de la structure de la GAPDH révèle une symétrie 222 du tétramère. Ainsi on s'attend à obtenir des formes cristallines contenant un monomère par unité asymétrique, chose qui n'a pas été observée jusqu'ici. Aussi peut-on obtenir un dimère ou un tétramère ou un dimère et un tétramère. En effet, parmi les treize GAPDH répertoriées dans le Tableau VI-3, cinq enzymes (38%) cristallisent avec un tétramère dans l'unité asymétrique, 5 enzymes (38%) cristallisent avec un dimère dans l'unité asymétrique, une enzyme avec un dimère et un tétramère, une enzyme avec deux tétramères et une enzyme qui cristallise avec 2 dimères indépendants dans l'unité asymétrique.

Tableau VI- 3 : Caractéristiques cristallographiques des différentes GAPDH dont la structure est résolue.

Partie A	<i>T. brucei</i>	<i>P.</i> <i>versicolor</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S.</i> <i>solfataricus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Mutant</i> C149A	<i>H.</i> <i>americanus</i>
Code PDB	1GGA	1SZJ	3GPD	1B7G	1GAD		1GPD
A(Å)	135.52	128.40	132.40	101.55	79.14	115,54	149.00
B(Å)	256.27	99.90	97.90	101.55	189.56	115,54	139.10
c(Å)	114.91	80.79	81.60	179.92	122.18	224,53	80.70
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90,00	90.00
β (°)	90.00	114.48	114.30	90.00	90.00	90,00	90.00
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	120,00	90.00
Groupe d'espace	<i>P2₁2₁2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>P4₁2₁2</i>	<i>C222</i>	<i>P3₁21</i>	<i>P2₁2₁2₁</i>
Nbre. de mol./u. asym.²	<i>T+D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
Axe cristallographique.³	Q	Q	Q	P	R	<i>aucun</i>	<i>aucun</i>
Paramètre de Matthews⁴	4,45	3,19	3,19	3,13	3,10	2,92	2.82
Résolution (Å)	3.20	2.00	3.50	2.05	1.80	2,18	2.90
Référence	(Vellieux et al., 1995)	(Song et al., 1983)	(Watson et al., 1972)	(Isupov et al., 1999)	(Duée et al., 1996)	Nos résultats	(Moras et al., 1975)

² Nombre de molécules par unité asymétrique. La lettre T correspond à un tétramère et D à un dimère.

³ Axe cristallographique confondu avec un axe non cristallographique (les axes P ou Q ou R)

⁴ Paramètre de Matthews $V_M = \text{Volume de la maille}/(\text{masse en Daltons} \times \text{la multiplicité dans la maille})$ en Å³/Da

Tableau VI-3b : Caractéristiques cristallographiques des différentes GAPDH dont la structure est résolue

Partie A	<i>M. fervidulus</i>	<i>T. aquaticus</i>	<i>B. stea.</i> <i>native</i>	<i>T. maritima</i>	<i>L. mexicana</i>	Mutant C149S
Code PDB	1CF2	1CER	1GD1	1HDG	1A7K	
<i>a</i>(Å)	136,70	144,77	82,44	95,70	67,9	140,48
<i>b</i>(Å)	153,30	148,77	124,10	95,70	81,0	87,91
<i>c</i>(Å)	74,90	149,50	82,54	296,28	131,9	119,92
α (°)	90,00	90,00	90,00	90,00	90,0	90,00
β (°)	90,00	90,00	108,98	90,00	95,0	119,00
γ (°)	90,00	90,00	90,00	120,00	90,0	90,00
Groupe d'espace	<i>P2₁2₁2</i>	<i>P2₁2₁2₁</i>	<i>P2₁</i>	<i>P6₁22</i>	<i>P2₁</i>	<i>C2</i>
Nbre. de mol./u.	<i>T</i>	<i>2T</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>2D</i>
asym.						
Axe	<i>aucun</i>	<i>aucun</i>	<i>aucun</i>	<i>P</i>	<i>aucun</i>	<i>P et R</i>
cristallographique						
Paramètre de	2,73	2,71	2,70	2,65	2,44	2,19
Matthews						
Résolution (Å)	2,10	2,50	1,80	2,50	2,80	2,10
Référence	(Charron et <i>al.</i> , 1999)	(Tanner et <i>al.</i> , 1996)	(Skarzynsk <i>i et al.</i> , 1987)	(Korndörfer <i>et al.</i> , 1995)	(Kim et <i>al.</i> , 1995)	<i>Nos</i> <i>résultats</i>

L'état cristallin solide résulte de l'empilement des molécules qui occupent des positions relatives bien définies dans l'espace. Selon l'arrangement régulier de ces molécules et de leur état d'agrégation, on peut parler de la compacité cristalline. Une étude succincte des empilements des treize structures cristallines connues (répertoriées dans le tableau VI-3) a montré que les empilements cristallins peuvent être très simples comme dans le cas de la GAPDH de *P. versicolor* et d'*E. coli*, ou complexes comme dans le cas de la GAPDH de *S. solfataricus*. La compacité de ces empilements dépend de la disposition des tétramères dans le cristal. Dans le cas de la GAPDH de *P. versicolor* (Song et al., 1998) cristallisant dans le groupe d'espace C2, l'analyse de l'empilement cristallin montre l'existence de gros canaux de solvant entre les tétramères suivant les directions a et c (figure VI-4). Cet empilement donne des cristaux de faible compacité (le paramètre de Matthews V_M est de $3,19 \text{ \AA}^3/\text{Da}$). Un autre empilement trivial est observé dans les cristaux de la GAPDH de *B. stearothermophilus* de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) et de *L. mexicana* (Kim et al., 1995). L'empilement de ces deux enzymes montre un enchevêtrement des tétramères constituant ainsi une association "clé serrure" (figure VI-5 et figure VI-6.a) qui augmente la surface de contact entre les tétramères en réduisant ainsi les espaces interstitiels dans le cristal. La compacité V_M est respectivement de $2,70 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ et $2,44 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ pour les cristaux de la GAPDH de *B. stearothermophilus* de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) et de *L. mexicana* (Kim et al., 1995).

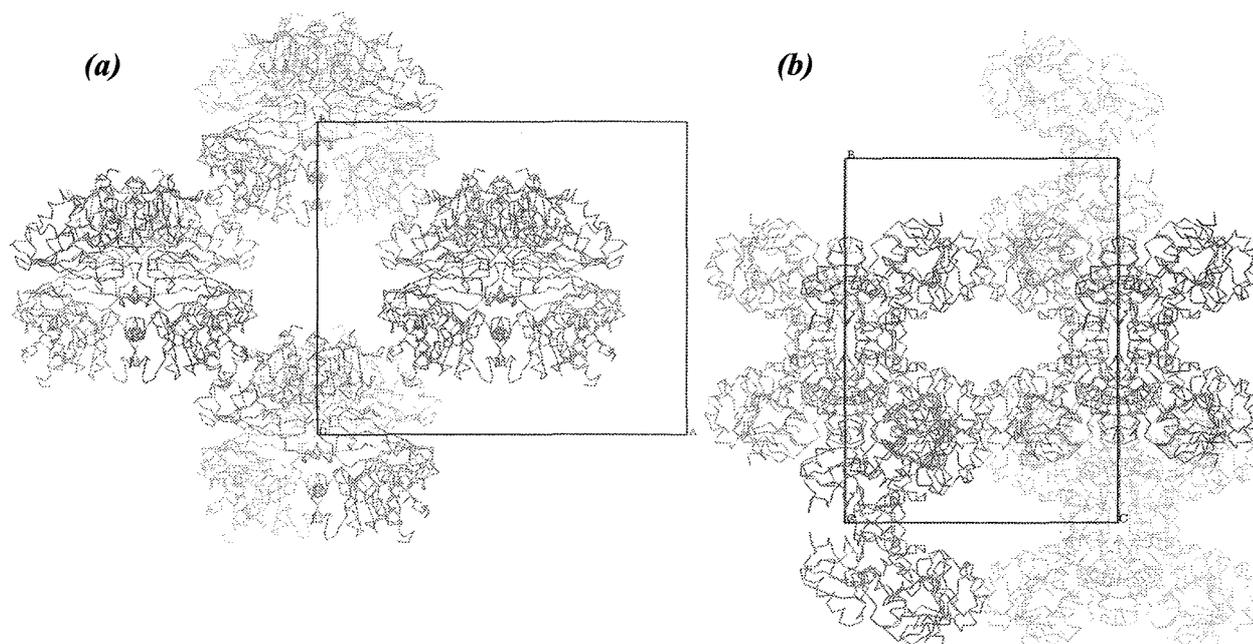


Figure VI- 4 : Empilement cristallin de la GAPDH de *P. versicolor* suivant (a) l'axe c et (b) l'axe a

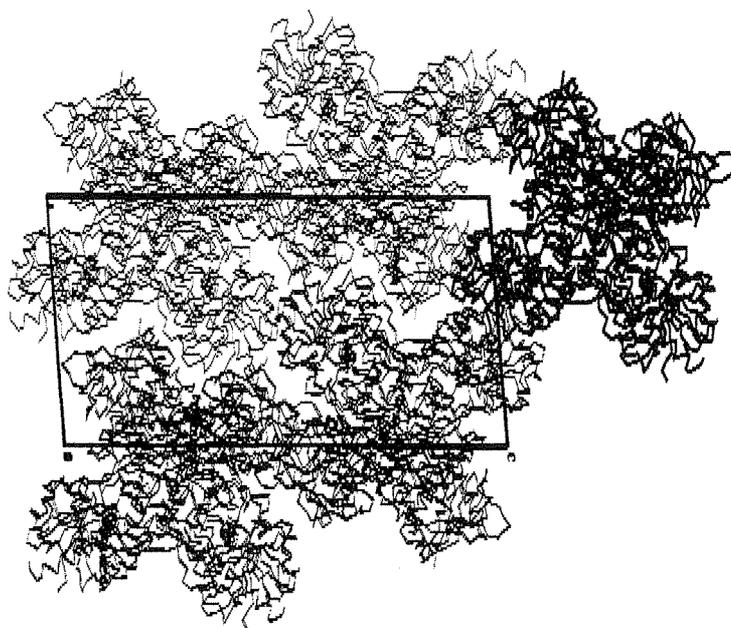


Figure VI- 5 : Empilement cristallin de la GAPDH de L. mexicana suivant l'axe b

Dans le cas des cristaux du complexe binaire II (forme BII), l'empilement cristallin montre aussi un enchevêtrement des tétramères. Cependant, dans ce cas, les tétramères sont imbriqués sur deux plans perpendiculaires (figure VI-6.b), ce qui rend l'empilement plus compact. L'empilement cristallin du complexe binaire II s'est avéré le plus compact de toutes les formes cristallines dans lesquelles les enzymes de la GAPDH ont été cristallisées (figure VI-7). Le paramètre de Matthews V_M est de $2,19 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ pour cette forme cristalline. Cet empilement contient des canaux de solvant très étroits, suivant l'axe c, de dimension $9 \text{ \AA} \times 11 \text{ \AA}$ environ.

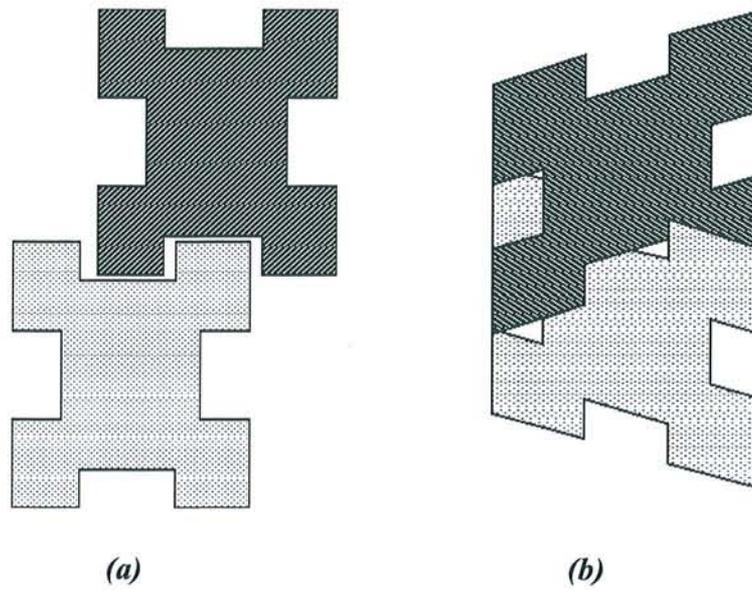


Figure VI- 6 : représentation schématique des empilements observés (a) dans les cristaux de la GAPDH de *L. mexicana* et de *B. stearothermophilus* et dans (b) les cristaux de complexe binaire II.

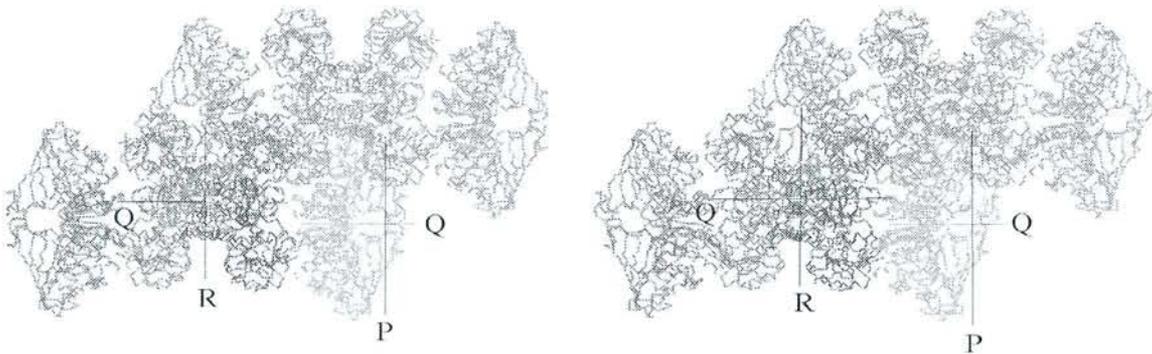


Figure VI- 7 : Empilement cristallin du complexe binaire II.

Les empilements cristallins des complexes binaires I et II ($P3_121$ et $C2$) constituent ainsi de nouvelles formes d'empilements, différentes de celles des autres GAPDH précédemment cristallisées.

3. Analyse structurale des complexes binaires I et II

3. 1. description succincte des structures des complexes binaires I et II

3. 1. 1. Introduction

Les structures générales de chacun des monomères des complexes binaires I et II sont similaires à celle de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987). Cependant, suite aux nouvelles conditions de cristallisation (formes cristallines BI et BII, cf. chapitre V), de nouveaux réarrangements des tétramères ont été obtenus. Afin de vérifier si ceux-ci provoquent des perturbations au niveau des interactions intra sous-unités, ces dernières sont de nouveau examinées. Ces interactions sont identiques à celles observées dans la structure de l'enzyme de type sauvage (cf. Annexe I).

Les interactions entre les sous-unités des structures des complexes binaires I et II sont aussi comparables à celles observées dans la structure de l'enzyme de type sauvage (cf. Annexe I).

3. 1. 1. Description du site actif

Le site actif peut être divisé en trois parties : une première partie où s'effectue l'attaque nucléophile sur le substrat qui est constitué par les deux acides aminés essentiels Cys149 (dont la chaîne latérale fixe de manière covalente le substrat (Harris & Perham, 1965)) et His176 (dont la chaîne latérale intervient à plusieurs niveaux de la réaction pour jouer le rôle de catalyseur acide-base et stabilise les intermédiaires réactionnels) et la partie nicotinamide du cofacteur, impliquée dans le transfert d'hydrure, les deux autres parties forment deux sites anioniques dont l'un est occupé par le phosphate inorganique (Pi) et l'autre par le phosphate en C₃ du substrat (Ps).

Pour permettre une analyse plus détaillée du site catalytique, ce dernier sera divisé en deux parties :

- site des résidus catalytiques. Ce site est constitué par les deux acides aminés essentiels Cys149 et His176 et le carbone C₄ du nicotinamide impliqué dans le transfert d'hydrure
- les deux sites de reconnaissance anionique Pi et Ps.

3. 1. 1. a. Résidus catalytiques

Le site de l'attaque nucléophile est pratiquement inchangé dans les deux structures des complexes binaires I et II par rapport à celle de l'enzyme de type sauvage. Les mutations, au niveau de la cystéine essentielle, sont confirmées par les cartes de densité électronique. Les résidus His176, Ala149 (pour le mutant C149A) et Ser149 (pour le mutant C149S) ont des densités bien définies et des facteurs B inférieurs à la valeur de B moyen de la structure totale du monomère (tableau VI-4).

Tableau VI- 4 : Les facteurs B moyens des chaînes latérales des résidus catalytiques Ala/Ser149 et His176 ainsi que ceux des monomères complets des complexes binaires I et II

	<i>Complexe binaire I</i>			<i>Complexe binaire II</i>		
	<i>His176</i>	<i>Ala149</i>	<i>Total</i>	<i>His176</i>	<i>Ser149</i>	<i>Total</i>
O	7,3	9,1	20.74	9,20	11,40	22,27
P	9,8	5,5	13.45	15,40	15,80	20,18
Q	6,8	7,1	18.40	11,70	15,50	20,56
R	7,3	6,1	13.79	12,60	14,70	21,17

3. 1. 1. b. Sites de reconnaissance anionique (*Pi* et *Ps*)

L'examen de la densité électronique des sites de fixation anionique du site actif met en évidence un large pic de densité électronique dans le site Ps. Par contre, le site Pi est vide (figure VI-8). Les conditions de cristallisation des deux complexes binaires I et II sont exemptes d'ions phosphates et sulfates. Ce pic a cependant pu être modélisé par un ion sulfate provenant vraisemblablement des conditions de purification par précipitation au sulfate d'ammonium. L'ion sulfate est resté fixé au site Ps même après 24 heures de dialyse de l'enzyme, contre un tampon Tris-HCl. Ce résultat expérimental semble montrer que le site Ps a plus d'affinité pour les anions sulfates que le site Pi dans les deux complexes binaires.

Le phosphate du site Ps partage les mêmes interactions que celles observées dans l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987). En effet, l'oxygène O₂ du sulfate forme une liaison hydrogène avec l'O₂N du cofacteur NAD et l'oxygène O₃ établit deux liaisons hydrogène avec l'Arg231 et la Thr179. Les conformations des résidus du site Ps des deux structures binaires I et II sont similaires à celles observées dans l'enzyme de type sauvage. Le

site Pi, lui, a révélé certaines modifications locales. Ces dernières seront discutées plus loin dans ce chapitre.

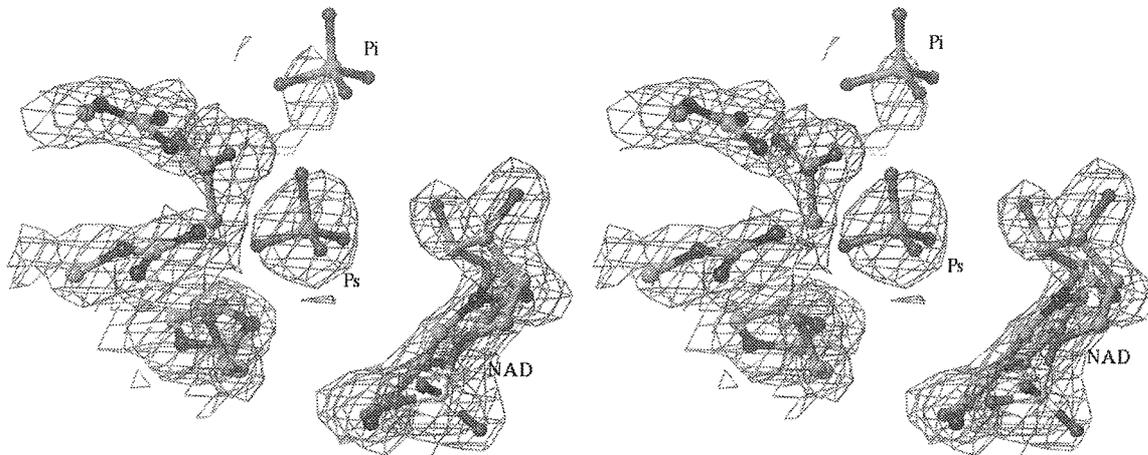


Figure VI- 8 : vue stéréoscopique du site actif du mutant C149S dans la densité électronique de type $(2F_o - F_c)$. Dans le site Ps l'ion sulfate est inséré dans la densité électronique. Un sulfate fictif est modélisé dans le site Pi vide de densité.

3.2. Comparaison de la structure des complexes binaires I et II avec l'enzyme de type sauvage.

3. 2. 1. Introduction

L'organisation générale des structures des monomères des complexes binaires I et II est similaire à celle de la structure de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987). Ainsi, le repliement de la protéine n'est pas affecté par la mutation du résidu Cys149 en alanine ou en sérine. Cependant, afin d'analyser de plus près les mouvements locaux de la chaîne principale des domaines catalytiques, une comparaison pas à pas (décrite ci-dessous) a été effectuée.

Remarque

Les superpositions des carbones α des domaines de fixation du cofacteur de chacune des structures des complexes binaires I et II avec celle de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) montre que ces dernières sont quasi superposables, à l'exception de quelques différences locales au niveau des résidus Pro23 et Gly61. Ces deux résidus appartiennent à deux boucles flexibles localisées sur la surface du monomère.

3. 2. 2. Méthode de comparaison

La structure tétramérique de la GAPDH est définie dans un système de coordonnées orthogonales formé par trois axes pseudo-binaires : P, Q et R (Rossmann et al., 1973). Dans ce système d'axes P, Q et R, on fait correspondre au monomère O les monomères P, Q et R respectivement. Cependant, dans un empilement cristallin donné, l'assignation du monomère O et donc, celle des autres monomères qui en découle, est arbitraire. En toute rigueur, la comparaison de monomères, entre la protéine de type sauvage et une protéine mutée devrait donc être effectuée en tenant compte de toutes les combinaisons de comparaisons possibles entre monomères ($O_{\text{native}}-O_{\text{mutée}}$; $O_{\text{native}}-P_{\text{mutée}}$...) soit 16 combinaisons avec un tétramère indépendant dans chacune des deux structures.

Afin de minimiser le nombre de comparaisons entre les domaines catalytiques des monomères de l'enzyme de type sauvage et ceux des deux complexes binaires I et II, nous avons comparé dans un premier temps les domaines catalytiques des monomères de l'enzyme de type sauvage entre eux. La figure VI-9 montre les déviations observées sur la position des $C\alpha$ après superposition des différents domaines catalytiques des monomères O, P, Q et R entre eux. Les graphes montrent que les domaines catalytiques de l'enzyme de type sauvage sont quasi superposables et peuvent être par conséquent considérés comme équivalents. L'écart type moyen est de 0,12 Å (valeur moyenne des quatre monomères).

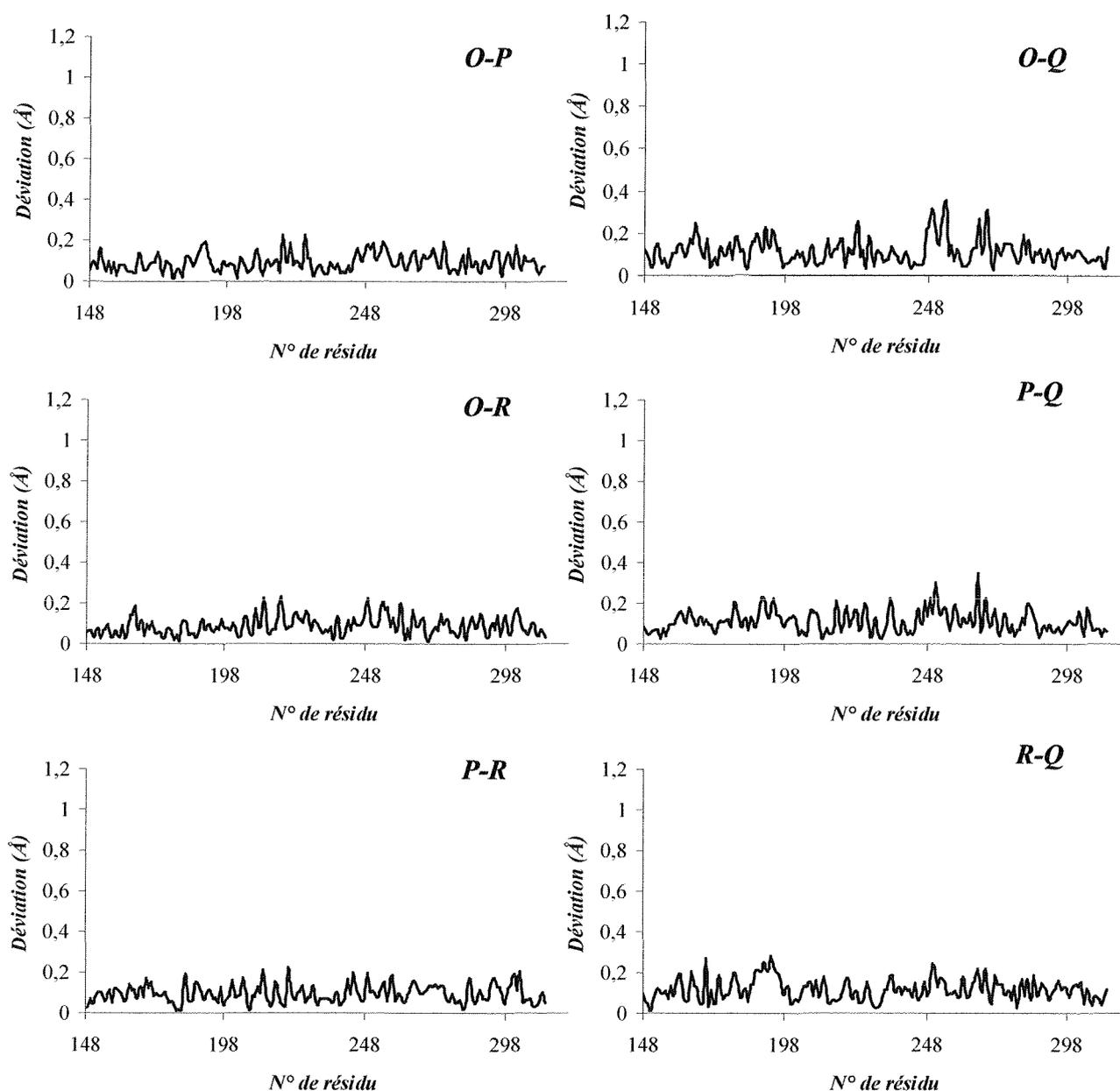


Figure VI- 9 : Déviation observée sur la position des C α après comparaison des domaines catalytiques des monomères de l'enzyme de type sauvage. O-P, O-Q, O-R, P-Q, P-R et R-Q désignent les différentes superpositions des monomères deux à deux.

Cette étude nous permet donc de considérer un monomère comme structure de référence pour les comparaisons avec les domaines catalytiques des structures des complexes binaires I et II. La structure du domaine catalytique du monomère O est ainsi choisie comme référence.

3. 2. 3. *Domaine catalytique du complexe binaire I*

Les superpositions des domaines catalytiques de chacun des monomères du complexe binaire I avec celui du monomère O (monomère de référence) de la protéine de type sauvage conduit à des déviations moyennes de 0,219 Å (O_{wt}/O_{CBI}), 0,206 Å (O_{wt}/P_{CBI}), 0,237 Å (O_{wt}/Q_{CBI}) et 0,225 Å (O_{wt}/R_{CBI}).

Les graphes de la figure VI-10 montrent les déviations observées sur la position des C α après superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) avec ceux des quatre monomères du complexe binaire I. Ces graphes montrent que les quatre domaines catalytiques du complexe binaire I sont quasi superposables à celui du monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987). Les seules différences notables se situent au niveau des résidus Thr208, Lys248, Glu266 et Asp301. Les trois derniers résidus (Lys248, Glu266 et Asp301) appartiennent à trois boucles (respectivement β_4 - α_3 , α_3 - β_5 et β_6 - β_7) situées à la surface de la protéine. Or, les boucles β_4 - α_3 et α_3 - β_5 sont impliquées dans l'empilement cristallin via les résidus Glu249 et Gly265, ce qui pourrait expliquer la déviation de ces premiers par rapport à leur position dans la structure de l'enzyme de type sauvage.

Quant au résidu Thr208, il appartient à la boucle 205-210, qui est enfouie au centre du tétramère dans l'interface entre le domaine catalytique et le domaine de fixation du cofacteur. Elle lie le brin β_2 à l'hélice α_2 . Les résidus de cette boucle n'étant pas impliqués dans des contacts intermoléculaires, l'empilement cristallin ne devrait pas constituer directement un facteur responsable de cette déviation.

De plus, les facteurs B moyens par résidu de cette région interne à la protéine sont plus grands que le facteur B moyen de la structure de la protéine (figure VI-11), laissant supposer une flexibilité de cette boucle plus grande que la moyenne. Les résidus de cette boucle n'étant impliqués dans aucun contact intramoléculaire de type polaire, son déplacement vers le centre de la cavité du site actif ne crée aucune contrainte stérique sur les autres parties du domaine.

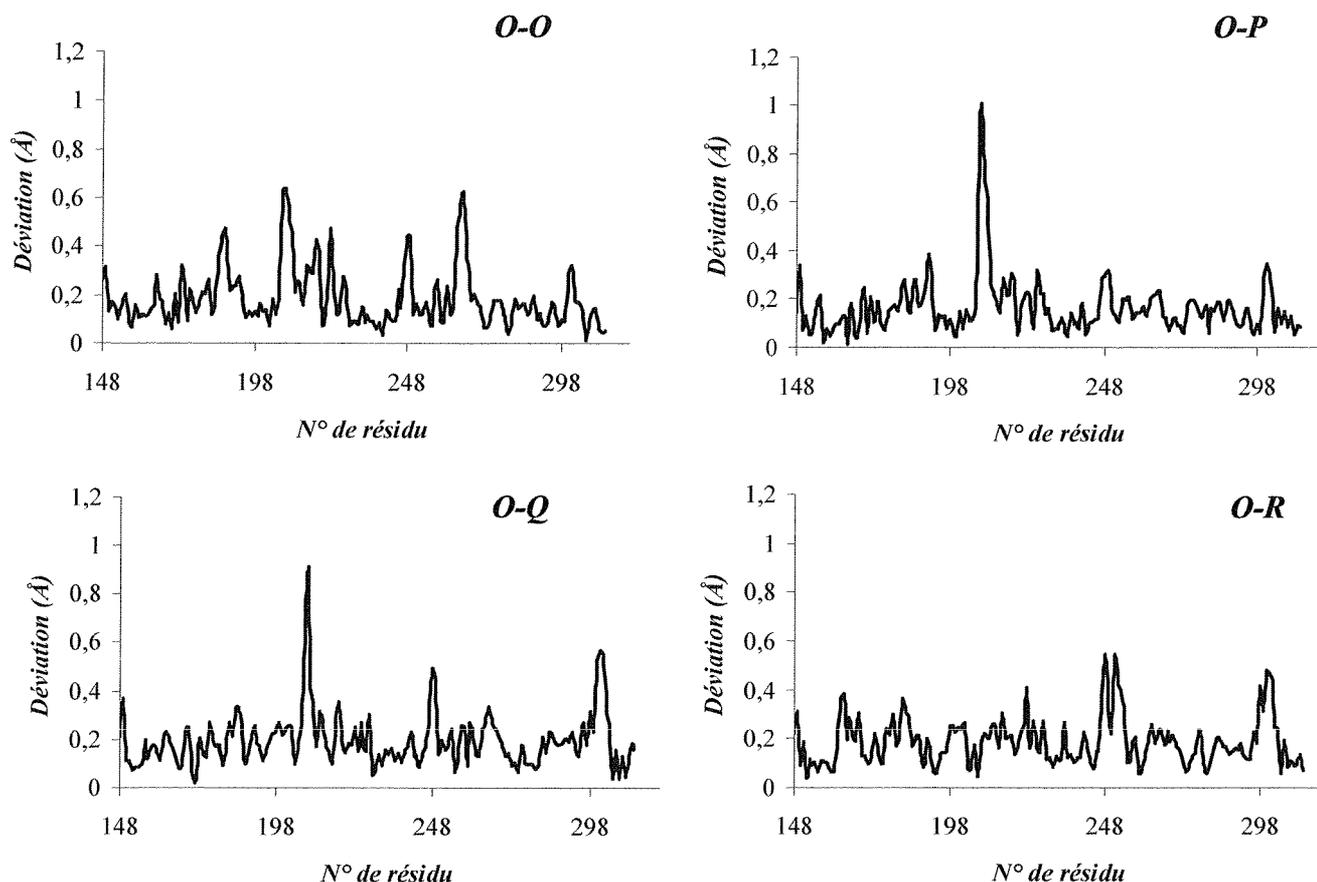


Figure VI- 10 : Déviation observée sur la position des $C\alpha$ après superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage avec ceux des quatre autres monomères du complexe binaire I.

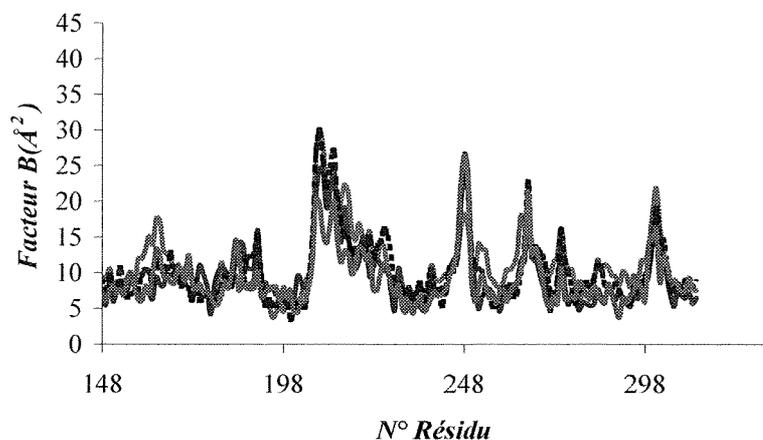


Figure VI- 11 : Facteur B (Å^2) par résidu pour des domaines catalytiques des monomères O (rouge), P (bleu), Q (noir) et R (vert) du complexe binaire I

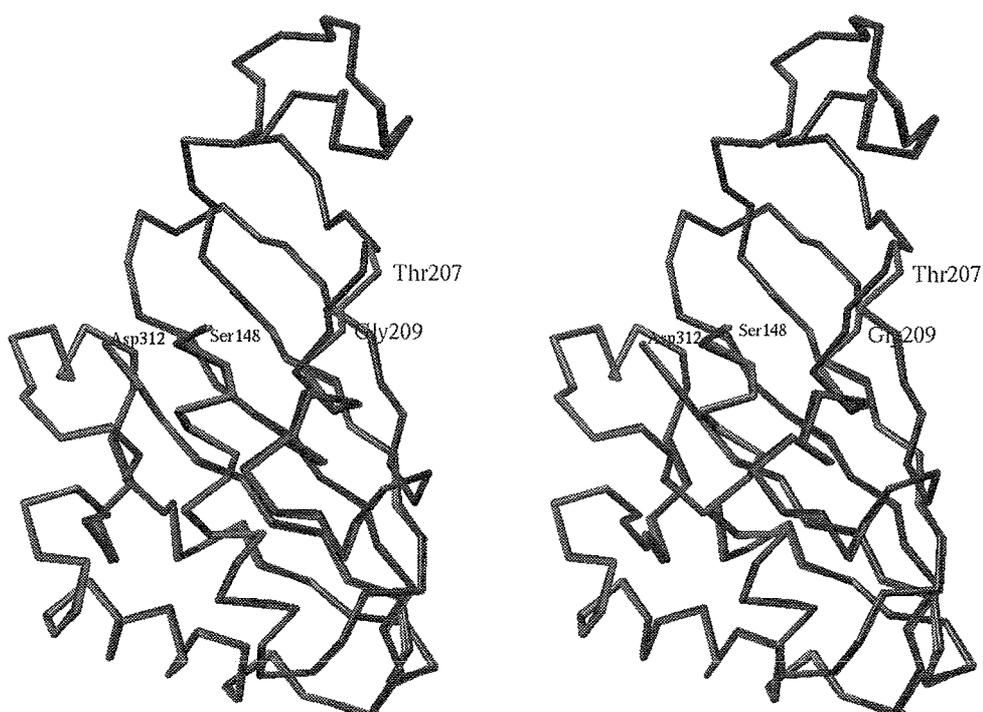


Figure VI- 12 : Superposition de la chaîne principale du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage (rouge) avec celui du monomère P (bleu) du complexe binaire I.

3. 2. 4. Domaine catalytique du complexe binaire II

Les superpositions des domaines catalytiques de chacun des monomères du complexe binaire II avec celui du monomère O de la protéine de type sauvage conduit à des déviations moyennes de 0,189 Å (O_{wt}/O_{CBII}), 0,209 Å (O_{wt}/Q_{CBII}), 0,270 Å (O_{wt}/P'_{CBII}) et 0,308 Å (O_{wt}/R'_{CBII}).

Les graphes de la figure VI-13 représentent les déviations observées sur la position des $C\alpha$ après la superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) avec ceux des quatre monomères du complexe binaire II. Ces graphes montrent un comportement différent pour les deux dimères indépendants (O-Q et P'-R'). Les monomères O et Q sont équivalents au monomère de l'enzyme de type sauvage alors que les monomères P' et R' présentent une différence conformationnelle au niveau de la boucle 205-210. Le déplacement de cette boucle est respectivement de 1,05 Å et 0,82 Å dans les monomères P' et R'. La figure VI-14 représente la superposition de la chaînes des $C\alpha$ du

domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) avec celui du monomère P' du complexe binaire II.

Or, bien que cette boucle présente des facteurs d'agitation thermique supérieurs à la moyenne, elle est parfaitement définie dans les cartes de densité électronique.

Ce résultat est assez surprenant car, comme nous l'avons déjà mentionné, la boucle 205-210 n'est pas directement impliquée dans l'empilement cristallin. Donc dans ce cas de figure, l'environnement cristallin différent des deux dimères se traduit par une conformation différente au niveau de la boucle 205-210.

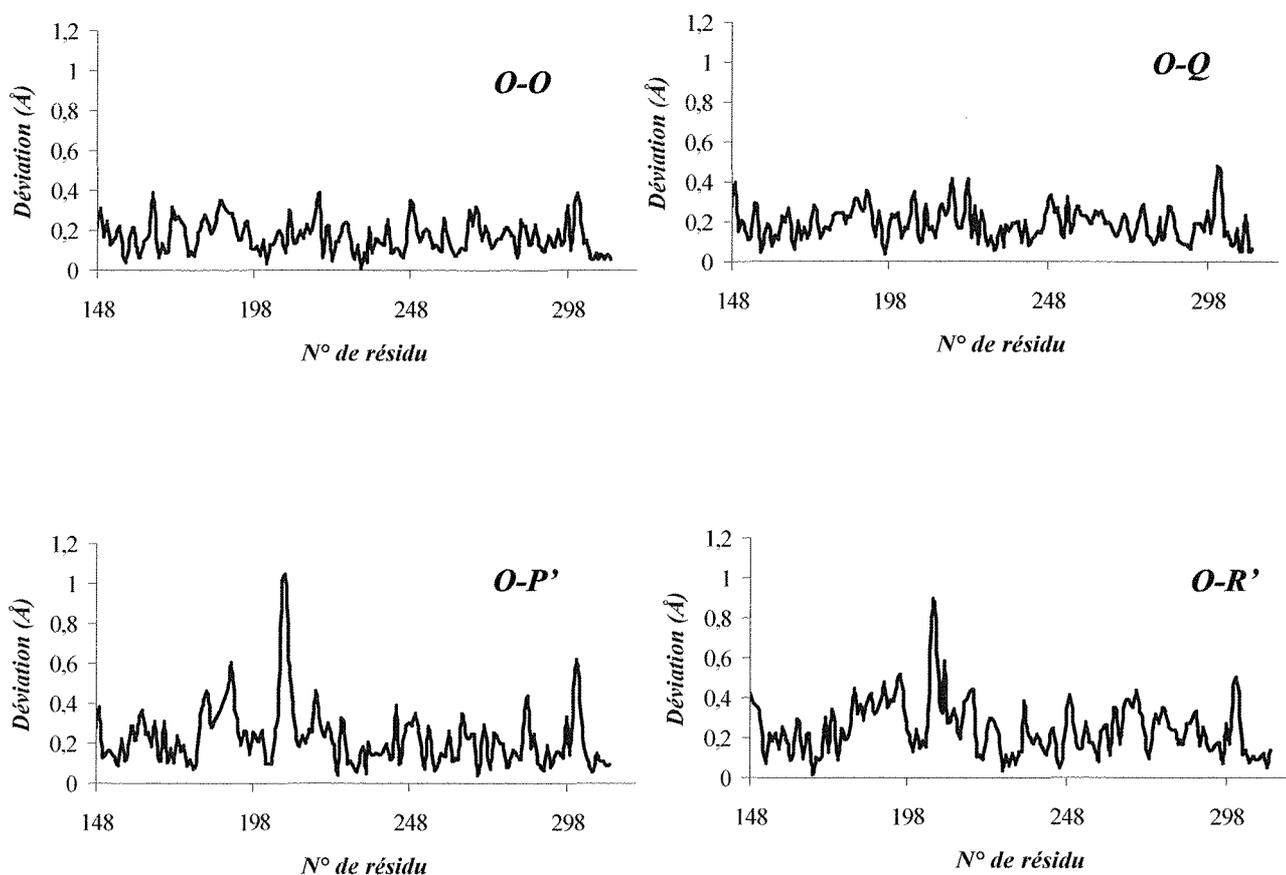


Figure VI-13 : Déviations observées sur la position des C α après superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage avec ceux des quatre autres monomères du complexe binaire II.

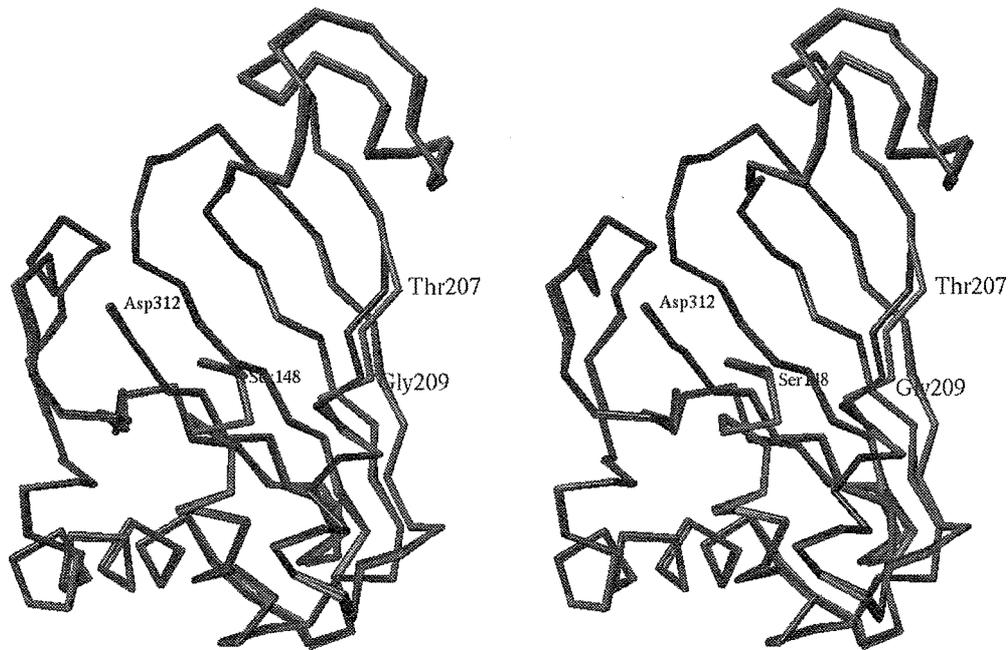


Figure VI-14 : Superposition de la chaîne des $C\alpha$ du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage (rouge) avec celui du monomère P' (bleu) du complexe binaire II.

3.3. Comparaison des sites Pi dans les structures de GAPDH connues.

Le site Pi, lui n'est pas occupé dans les deux structures binaires et révèle un changement conformationnel de la chaîne principale de la boucle 205 à 210 (β_2 - α_2). Ce changement conformationnel est beaucoup plus notable dans les monomères P des structures des complexes binaires I et II. Cette observation est importante car cette boucle 205-210, conservée dans les structures primaires des GAPDH, est un élément essentiel dans la formation du site Pi. Ce résultat est d'autant plus intéressant que les 9 structures de GAPDH déterminées à haute résolution ne présentent pas la même conformation au niveau de cette boucle 205-210. Six structures présentent la même conformation (notée A) que celle observée dans la GAPDH de *B. stearothermophilus* révélant donc une position identique du site Pi (GAPDH humaine, de homard (forme apo), *B. stearothermophilus*, *Trypanosoma brucei*, *Thermus aquaticus*, *Escherichia coli* et *Trypanosoma cruzi*) (Duée et al., 1996; Mercer et al., 1976; Murthy et al., 1980; Skarzynski et al., 1987; Souza et al., 1998; Tanner et al., 1996; Vellieux *et al.*, 1993). Deux structures présentent une autre conformation (notée B) de la

boucle 205-210, conduisant à un site Pi plus proche du cœur du site actif (i.e. de Cys149 et His176) (GAPDH de *T. martima* et *L. mexicana* (Kim et al., 1995; Korndörfer et al., 1995). Une dernière présente à la fois les deux conformations A et B (GAPDH de *P. versicolor* (Lin et al., 1993). En effet, la conformation A est observée dans la structure de la forme holo tandis que la forme carboxyméthylée (où la Cys149 est carboxyméthylée) présente la conformation B (figure VI-15).

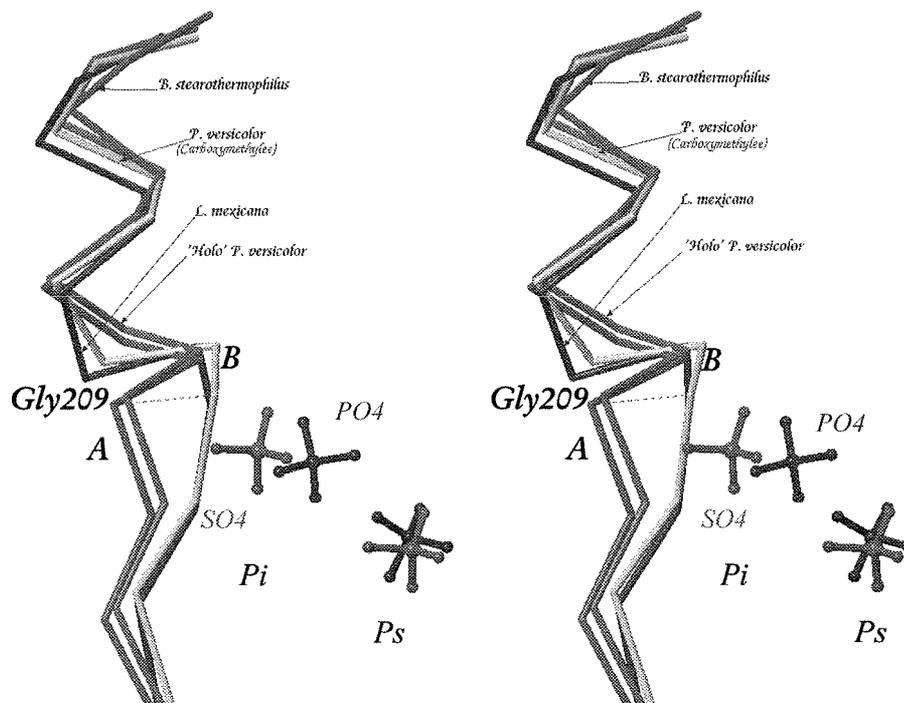


Figure VI- 15 : Superposition des carbonés α de la boucle 205-210 des GAPDH de *B. stearothermophilus* (rouge), de *P. versicolor* sous forme holo (mauve) et sous forme carboxyméthylée (jaune) et de *L. mexicana* (bleue). Les sulfates de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (rouge) et les phosphate de la GAPDH de *L. mexicana* (bleu) sont modélisés dans les sites anioniques. Les lettres A et B représentent respectivement les conformations nommées A et B dans le texte.

Par ailleurs, la structure de la GAPDH de homard (Moras et al., 1975), présente un tétramère asymétrique. Un dimère (*P-R*), dont les deux sites anioniques sont occupés par des ions sulfate, est supposé inactif. Les boucles 205-210 du site Pi de ce dimère sont comparables à celle de l'holoenzyme de type sauvage de *B. stearothermophilus* (Skarzynski et al., 1987) et présentent la conformation A. Dans l'autre dimère (*O-Q*), supposé actif, les deux

sites Ps de ce dimère sont occupés par des sulfates. Les sites Pi, par contre, sont vides. De plus, les boucles 205-210 de ce dimère présentent un déplacement vers le centre du site actif. Ce déplacement est comparable à celui observé dans les enzymes de *T. martima* et *L. mexicana* (Kim et al., 1995; Korndörfer et al., 1995) (conformation B). La superposition des monomères O et R de la structure de la GAPDH de homard (Moras et al., 1975) montre que la Gly209, intervenant dans la fixation de l'anion du site Pi, est déplacée de 2,52 Å vers la Cys149 dans le dimère O-Q, par rapport au dimère P-R (figure VI-16).

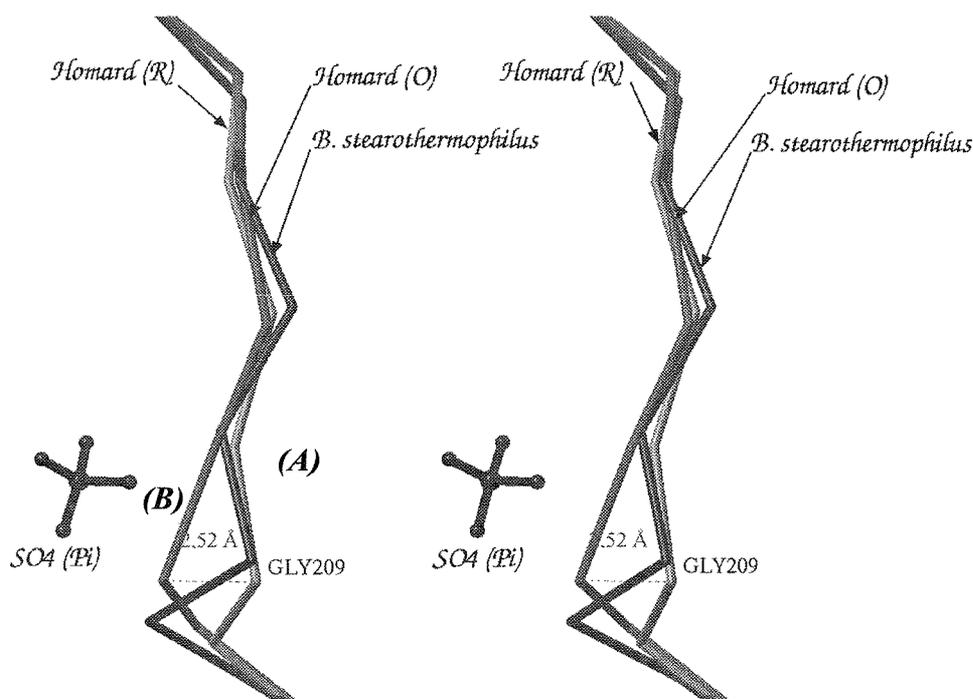


Figure VI- 16 : vue stéréoscopique de la superposition des monomères O (rouge) et R (vert) de l'enzyme de homard et du monomère O (bleu) de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. Le sulfate est modélisé dans le site Pi de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. Les lettres A et B représentent respectivement les conformations nommées A et B dans le texte.

Nos résultats cristallographiques, ajoutés à ceux de la littérature, montrent une certaine liberté conformationnelle au niveau de la boucle 205-210. De plus, en se basant sur des aspects conformationnels et énergétiques, Kim et al. (1995) et Song et al. (1999) ont montré clairement que la conformation B est plus favorable que la conformation A pour l'étape de phosphorylation dans la réaction catalytique. Ceci laisse donc supposer, que lors de la réaction catalytique, cette boucle, enfouie au centre du tétramère, est capable de se déplacer de la

conformation A (éloignée de la cystéine149) vers la conformation B (plus proche de la cystéine149) afin de positionner favorablement le phosphate inorganique pour l'étape de phosphorylation.

4. Analyse structurale des complexes ternaires I et II

4. 1. Introduction

L'organisation générale des structures des monomères des complexes ternaires I et II est similaire à celle de la structure de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987). La superposition des carbones α des domaines de fixation du cofacteur de chacune des structures des complexes ternaires I et II avec celle de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) montre que ces dernières sont quasi superposables. Afin de mettre en évidence d'éventuels changements conformationnels au niveau du domaine catalytique, liés à la fixation du substrat sur l'enzyme, une comparaison pas à pas a été effectuée. Une description détaillée du site actif sera faite dans le paragraphe 4.3.

4. 2. Comparaison du domaine catalytique des complexes ternaires I et II

La méthode de comparaison des domaines catalytiques des monomères des complexes ternaires I et II avec ceux de l'enzyme de type sauvage est similaire à celle adoptée pour les complexes binaires I et II (cf. §3.2.1). En effet, la structure du domaine catalytique du monomère O est choisie comme référence pour les différentes comparaisons.

4. 2. 1. Domaine catalytique du complexe ternaire I

La superposition du domaine catalytique de chacun des monomères du complexe ternaire I avec celui du monomère O (monomère de référence) de l'enzyme de type sauvage conduit à des déviations moyennes de 0.172 Å (O_{wt}/O_{CBI}), 0.154 Å (O_{wt}/P_{CBI}), 0.185 Å (O_{wt}/Q_{CBI}) et 0.196 Å (O_{wt}/R_{CBI}).

Les graphes de la figure VI-17 montrent les déviations observées sur la position des $C\alpha$ après superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) avec ceux des quatre monomères du complexe ternaire I. Ces graphes montrent que les quatre domaines catalytiques du complexe ternaire I sont quasi superposables à celui du monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987). Les seules différences notables se situent au niveau des résidus Lys248, Glu266 et Asp301.

La déviation de ces trois résidus, situés à la surface de la protéine, avait déjà été observée précédemment dans le complexe binaire I. La boucle 205-210 présente, quant à elle, une déviation maximale par rapport au monomère O de l'enzyme de type sauvage qui est respectivement de 0,43 Å, 0,5 Å, 0,47 Å et 0,14 Å pour les monomères O, P, Q et R. Cette valeur est supérieure à la valeur de déviation moyenne (voir ci-dessus), ce qui confirme le caractère flexible de cette région. Néanmoins, on ne retrouve pas l'amplitude du déplacement qui avait été observée dans le complexe binaire I.

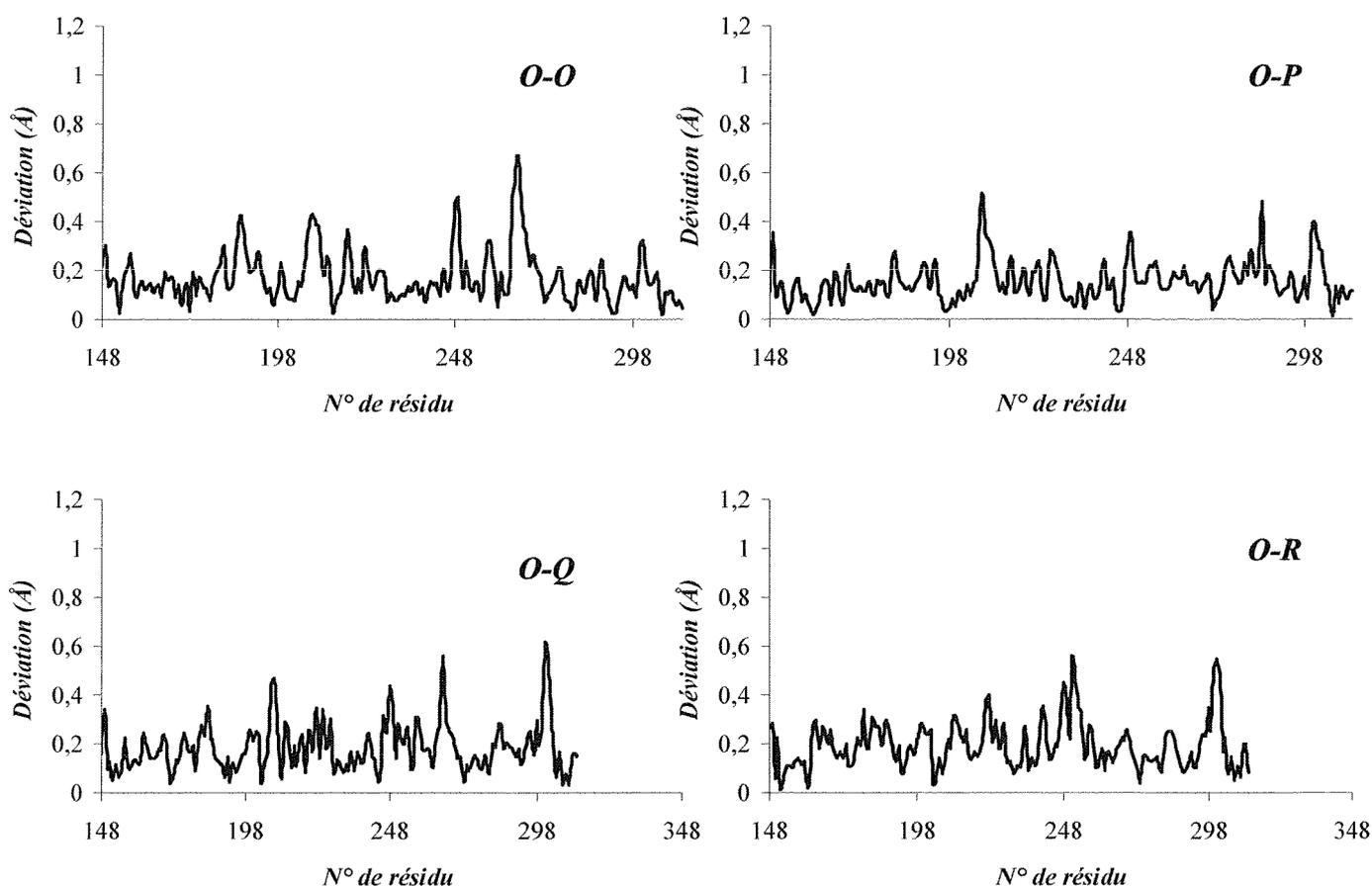


Figure VI- 17 : Déviation observée sur la position des C α après superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage avec ceux des quatre autres monomères du complexe ternaire I

4. 2. 2. Domaine catalytique du complexe ternaire II

La superposition du domaine catalytique de chacun des monomères du complexe ternaire II avec celui du monomère O de la protéine de type sauvage conduit à des déviations

moyennes de 0.172 Å (O_{wt}/O_{CBI}), 0.154 Å (O_{wt}/P_{CBI}), 0.185 Å (O_{wt}/Q_{CBI}) et 0.196 Å (O_{wt}/R_{CBI}).

Les graphes des déviations moyennes observées sur la position des $C\alpha$, après superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987) avec ceux des quatre monomères du complexe binaire I (figure VI-18), montrent que les quatre domaines catalytiques du complexe ternaire II ne présentent pas de différences majeures par rapport au monomère O de l'enzyme de type sauvage (Skarzynski et al., 1987).

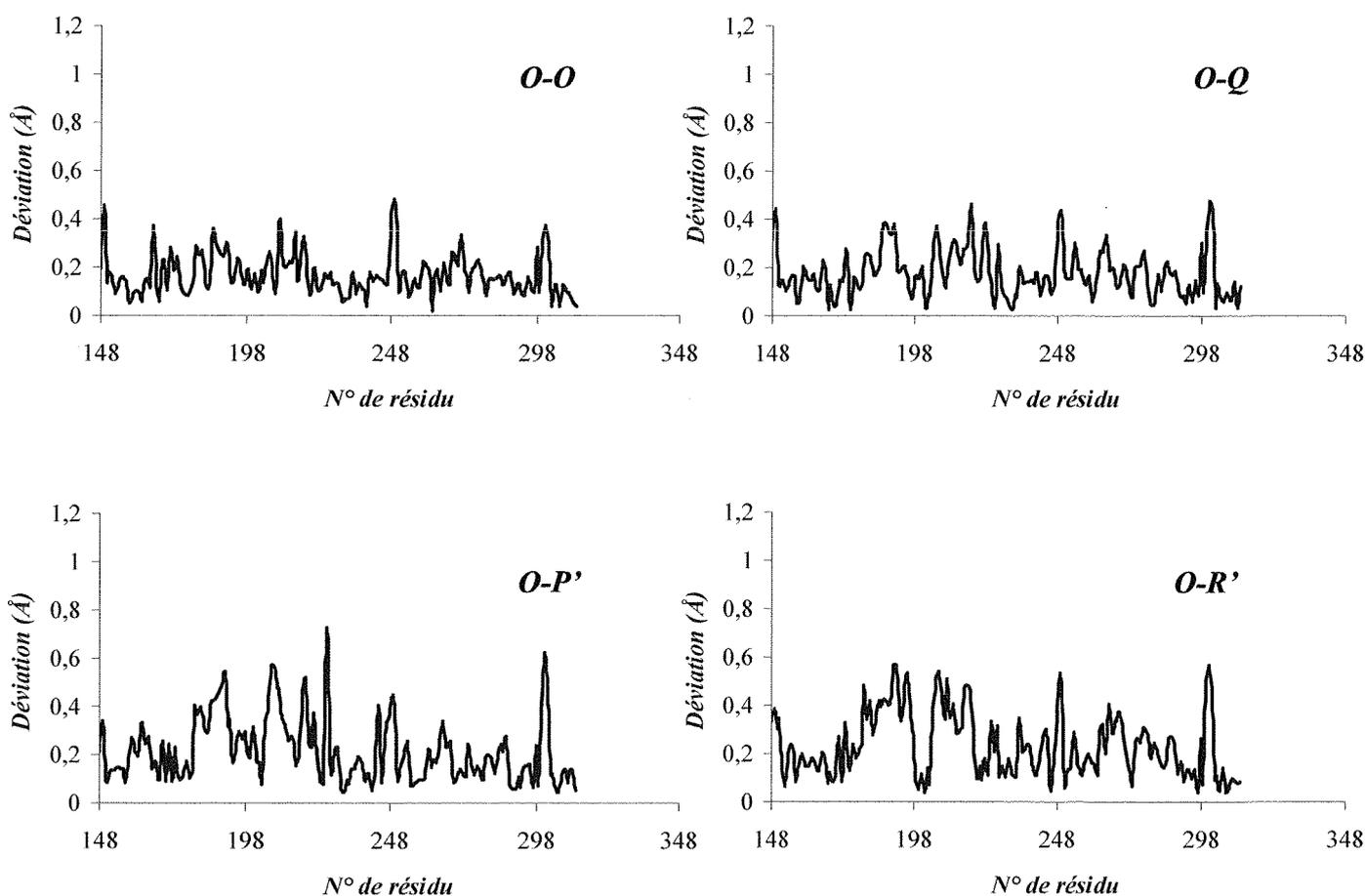


Figure VI- 18 : Déviation observée sur la position des $C\alpha$ après superposition du domaine catalytique du monomère O de l'enzyme de type sauvage avec ceux des quatre autres monomères du complexe ternaire II.

La déviation maximale de la boucle 205-210 par rapport au monomère O de l'enzyme de type sauvage est respectivement de 0,33 Å, 0,38 Å, 0,6 Å et 0,54 Å pour les monomères O, Q, P' et R' dans les monomères du complexe ternaire I.

Les deux dimères indépendants (O-Q et P'-R') présentent un comportement différent au niveau du domaine catalytique. Cette différence entre les deux dimères indépendants a déjà été constatée et expliquée dans la structure du complexe binaire II (cf. § 3. 2. 4).

4. 3. Description des sites actifs des complexes ternaires I et II

L'analyse des cartes de densité électronique différence (Fo-Fc) des deux structures de complexes ternaires I et II, révèle clairement un large pic de densité positive qui correspond sans ambiguïté au substrat *D-G3P* (pour la nomenclature des atomes, se reporter à la figure VI-19).

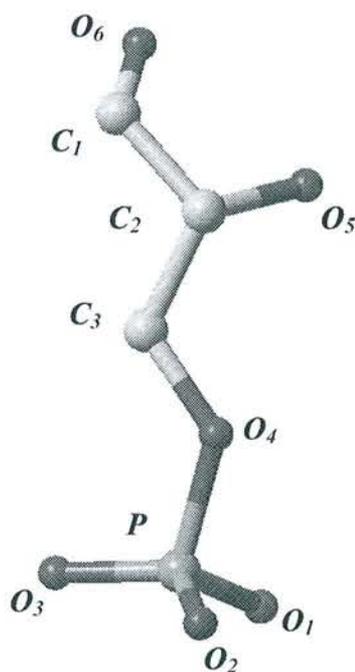


Figure VI-19 : Nomenclature du *D-G3P* utilisée dans l'affinement des structures ternaires I et II.

Le substrat adopte la même conformation dans les deux structures des complexes ternaires I et II et développe quasiment les mêmes interactions avec l'enzyme dans les deux cas (tableau VI-5 et VI-6), à savoir :

- Le substrat (énantiomère D) est lié de façon non covalente, le groupement phosphate en C₃ étant positionné dans le site Ps.
- Bien qu'en solution, l'équilibre aldéhyde libre \rightleftharpoons gem-diol soit fortement déplacé vers la forme hydratée (gem-diol), l'analyse de la carte de densité électronique (figure VI-20) permet de conclure, sans ambiguïté, que le substrat lié dans le site actif se présente sous forme réactive (forme aldéhyde libre).

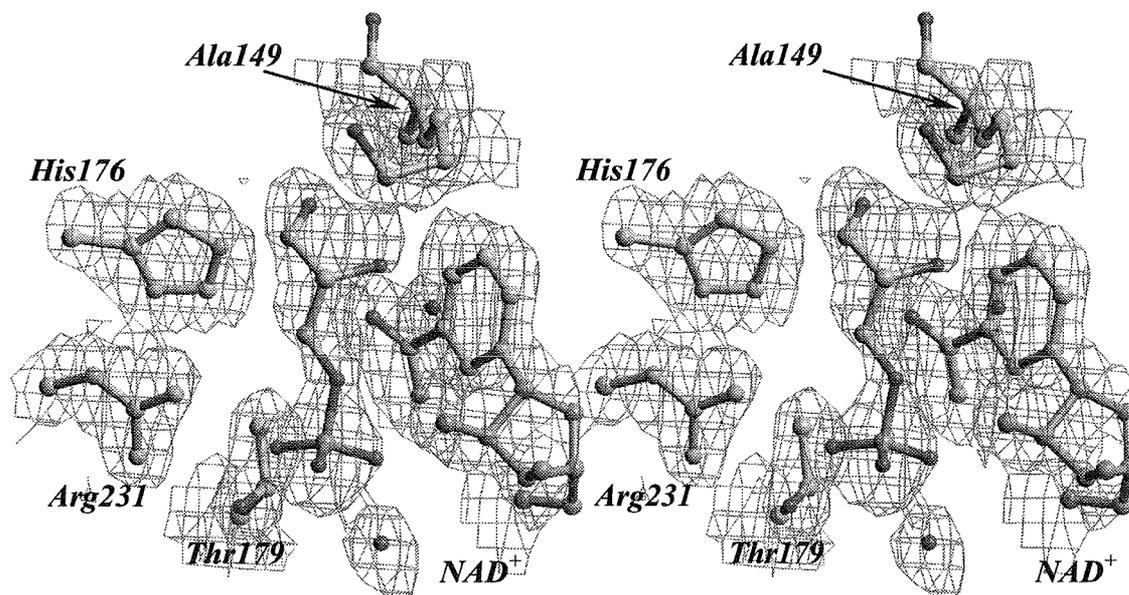


Figure VI- 20 : Vue stéréoscopique de la densité électronique du site actif du complexe ternaire I. Le modèle du D-G3P est présenté dans la figure. La carte de densité électronique est de type $2F_o - F_c$, niveau de contour $1,5\sigma$.

- Le groupement hydroxyle en C₂ du G3P pointe vers le groupement amidique NH du résidu 149. La distance G3P-O₅...Ser149-NH, bien qu'un peu longue (de l'ordre de 3.6 Å dans les deux complexes), laisse supposer une interaction faible mais effective entre ces groupements. Ce groupe hydroxyle est également en interaction avec une molécule d'eau (wat1388) présente dans les quatre monomères des deux structures. Cette molécule d'eau appartient à un réseau de molécules d'eau et forme également une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle en 2' du ribose adjacent au nicotinamide du NAD⁺ (O2'N) (figure VI-21).
- Le groupement phosphate en C₃ du G3P interagit avec les chaînes latérales des résidus Arg231 et Thr179 et avec le groupement hydroxyle O2'N du NAD⁺. Ces interactions sont

exactement les mêmes que celles formées avec l'ion sulfate occupant ce site dans la structure holo de l'enzyme de type sauvage.

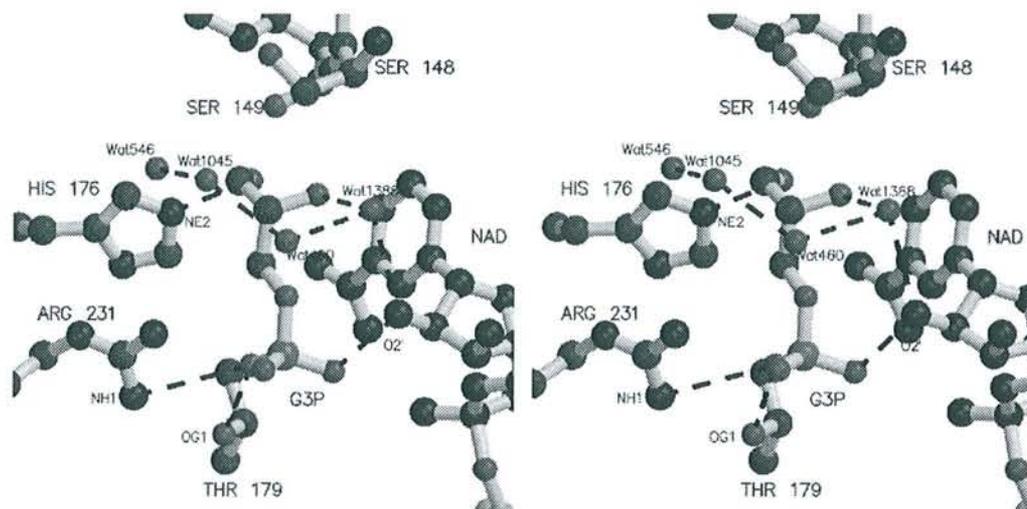


Figure VI- 21 : Vue stéréoscopique du site actif du complexe ternaire II montrant les interactions du groupement hydroxyle en C2 du substrat avec le réseau de molécules d'eau du site actif et l'atome d'oxygène O2' du NAD via la molécule wat1388.

➤ L'atome d'oxygène porté par le carbone aldéhydique du substrat (O6) forme une liaison hydrogène avec l'atome N_{ε2} de l'His176 (figure VI-22). Une seconde interaction est observée dans la structure du complexe ternaire II avec l'oxygène O_γ de Ser148.

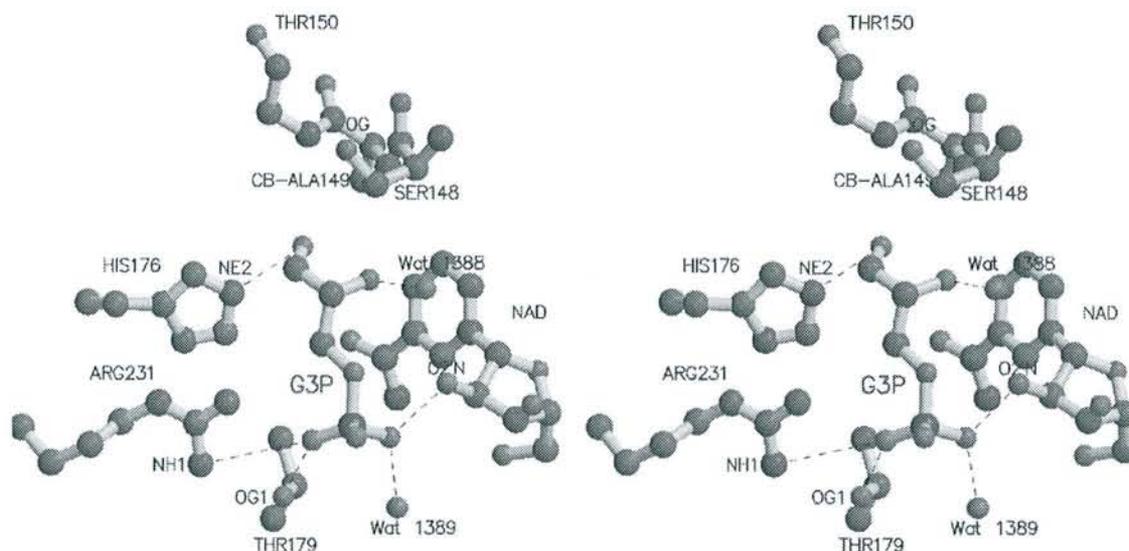


Figure VI- 22 : Vue stéréoscopique du site actif du complexe ternaire I mettant en évidence les résidus intervenant dans la fixation du substrat G3P.

Tableau VI- 5 : les interactions et les distances entre le G3P et les ligands du site actif du complexe ternaire I

<i>Liaisons</i>	<i>Monomère O</i>	<i>Monomère P</i>	<i>Monomère Q</i>	<i>Monomère R</i>
	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)
G3P-O1....2’N-NAD	2.90	2.95	3.05	3.12
G3P-O1....Wat1389	2.53	2.49	2.70	-
G3P-O2.... Oγ1-T179	2.5	2.44	2.55	2.49
G3P-O2.... Nη1-R231	2.96	2.87	2.79	2.92
G3P-O3....2’N-NAD	3.34	3.43	3.57	3.57
G3P-O5....Wat1388	2.83	2.77	2.62	2.49
G3P-O5.... N-A149	3.52	3.66	3.47	3.82
G3P-O6....Nε2-H176	2.88	2.80	2.82	2.76

Tableau VI- 6 : les interactions et les distances entre le G3P et les ligands du site actif du complexe ternaire II

<i>Liaisons</i>	<i>Monomère O</i>	<i>Monomère P</i>	<i>Monomère Q’</i>	<i>Monomère R’</i>
	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)
G3P-O1....2’N-NAD	2.82	2.67	3.13	2.64
G3P-O1....Wat1389	2.58	2.80	-	2.83
G3P-O2.... Oγ1-T179	2.46	2.56	2.41	2.51
G3P-O2.... Nη1-R231	2.74	2.93	3.02	2.71
G3P-O5....Wat1388	2.68	2.47	2.56	2.67
G3P-O5.... N-S149	3.56	3.57	3.68	3.58
G3P-O6....Nε2-H176	2.60	2.72	2.50	2.43
G3P-O6....S148-Oγ	2.46	2.51	2.41	2.40

4. 3. 1. Comparaison des sites actifs des complexes ternaires avec celui de l’holoenzyme de type sauvage

La superposition des chaînes latérales du site Ps contribuant dans la fixation du phosphate en C₃ du substrat dans les complexes ternaires I et II et du sulfate dans l’enzyme de type sauvage montre que celles-ci sont superposables (figure VI- 23).

En ce qui concerne les résidus catalytiques, l'His176 du complexe ternaire I est positionné de façon identique à celle de la structure holo de l'enzyme de type sauvage et les carbones C α et C β de l'Ala149 du complexe ternaire sont superposables à ceux de la Cys149. Cependant, dans le complexe ternaire II, on observe un léger changement conformationnel du résidu Ser149 par rapport au résidu Cys149 de l'enzyme de type sauvage (Figure VI-21). Ce résultat sera discuté plus loin dans ce chapitre.

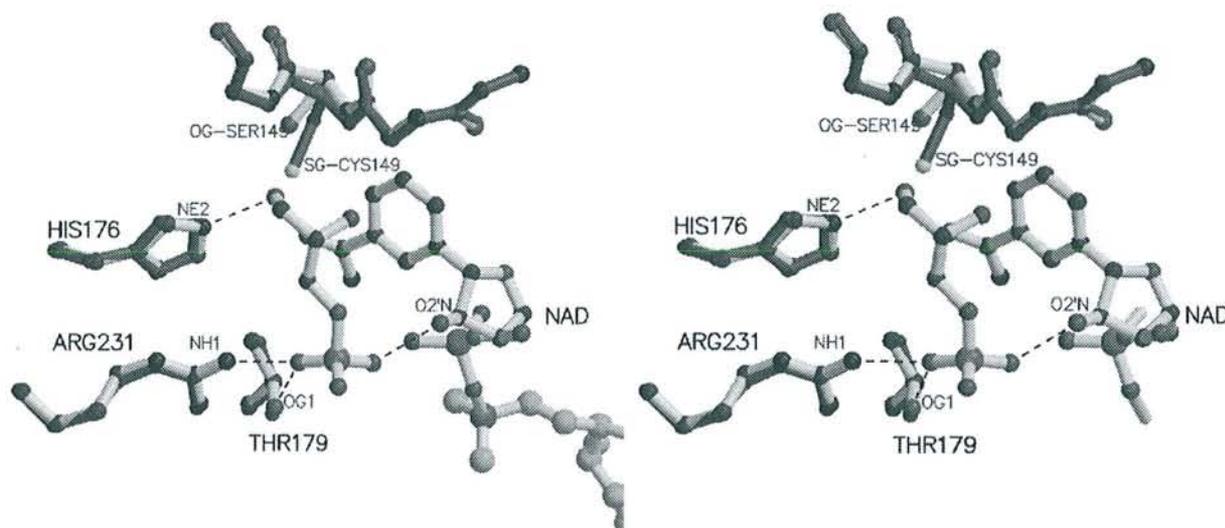


Figure VI- 23 : Superposition des monomères O de la GAPDH de *B. stearothermophilus* de type sauvage sous forme holo (rouge) et du complexe ternaire II (blanc).

5.1. Apport de l'analyse structurale des complexes ternaires à la compréhension du mécanisme catalytique.

Le schéma général de la réaction enzymatique a été illustré et discuté dans le chapitre II. Seuls seront discutés dans cette partie les résultats structuraux permettant d'expliquer certaines propriétés de l'enzyme comme la stéréospécificité de substrat, ou d'apporter des éléments de réponse quant à la contribution des interactions enzyme / substrat au mécanisme catalytique

Discussion sur la position de la partie aldéhyde du substrat :

Le substrat se présente dans une conformation identique dans les deux structures de complexes ternaires que nous avons obtenues. L'examen de la zone du cœur du site actif du complexe ternaire I permet de connaître la position de l'atome d'oxygène O₆ du carbone C₁ de configuration sp², dans le substrat G3P. Dans cette hybridation, cet oxygène pointe vers la chaîne latérale du résidu Ala149 et occupe une position sensiblement équivalente à celle de l'atome de soufre du résidu Cys149 dans la structure de type sauvage. Ceci implique que dans le cas du complexe ternaire II, la fixation du substrat a entraîné un mouvement de la chaîne principale de la sérine 149. En effet, si l'on utilise comme référence le résidu His176 (dont la position reste fixe dans les différents complexes binaires ou ternaires par rapport à celle occupée au sein de la structure holoenzyme de type sauvage), la distance O_γ-Ser149/ N_{ε2}-His176 est de 4,26 Å dans le complexe ternaire II alors que la distance O_γ-Ser149/ N_{ε2}-His176 était de 3,45 Å dans le complexe binaire II. En admettant que le substrat se fixe dans la même position dans l'enzyme sauvage, ceci impliquerait un changement conformationnel important, non seulement de la chaîne latérale, mais aussi de la chaîne principale de la Cys149. La modélisation du substrat dans le site actif de l'holoenzyme de type sauvage, dans une position identique à celle trouvée dans les deux complexes ternaires, montre qu'en l'absence de ce changement conformationnel, la distance entre l'atome O₆ du substrat et le S_γ de la Cys149 est beaucoup trop courte et résulte en une interpénétration des sphères de Van der Waals. L'hypothèse de ce changement conformationnel implique que cette zone possède une certaine liberté conformationnelle et ce point a été confirmé par des modélisations théoriques réalisées par l'équipe de B. Maigret (communication personnelle). On pourrait alors raisonnablement supposer, qu'au tout début de l'acte catalytique, la fixation du substrat G3P induise un mouvement des chaînes principale et latérale de Cys149 lors de la catalyse, le résidu His176 conservant rigoureusement la même position dans les complexes ternaires par rapport à la structure holoenzyme de type sauvage. On peut noter que la rigidité de la position de l'His176 a elle aussi été confirmée par les études de modélisation théoriques de B. Maigret (communication personnelle).

L'utilisation d'un mutant possédant une activité catalytique résiduelle pour l'obtention d'un complexe ternaire, pouvait à priori, laisser espérer l'obtention d'un complexe covalent enzyme/substrat dans le cas du mutant Ser149. Néanmoins, les études cinétiques plus approfondies par l'équipe du Pr. Branlant (Boschi-Muller & Branlant, 1999) réalisées sur ce mutant parallèlement à notre étude structurale, ont montré que la substitution de la cystéine essentielle de l'enzyme par une sérine entraînait une diminution drastique de l'efficacité catalytique par rapport à l'enzyme de type sauvage (une diminution du k_{cat} d'un facteur $1,1.10^4$, tableau V-1), l'étape d'acylation devenant limitante pour l'enzyme mutée. Dans ces conditions, l'obtention d'un complexe covalent devenait beaucoup plus improbable et effectivement, la résolution de la structure du complexe ternaire II a révélé que le substrat était lié de façon non covalente dans le site actif du mutant Ser149.

A partir de leurs études cinétiques, Boschi-Muller et al. (1999) ont supposé que la très faible réactivité du mutant C149S pourrait s'expliquer soit par une attaque non efficace de la sérine 149 sur la fonction aldéhyde du G3P, due au faible caractère nucléophile de la sérine, soit par un mauvais positionnement du groupement hydroxyle de la sérine par rapport à la fonction aldéhydique du substrat. En nous basant sur la structure du complexe ternaire II, nous avons successivement regardé si l'environnement protéique était capable d'activer le caractère nucléophile de la Ser149 et examiné si l'orientation de l'hydroxyle (OH) en position γ était favorable à une attaque N-terminal sur le carbone aldéhydique.

L'existence d'un dipôle d'une hélice α est connue pour générer l'équivalent d'une charge positive, à l'extrémité N-terminale des hélices α , qui pourrait influencer la nucléophilie du résidu 149 présent à l'extrémité N-terminale des hélices α_1 . Toutefois, les résultats obtenus par Talfournier *et al.* (Talfournier et al., 1998) sur la GAPDH de *B. stearothermophilus* montrent que la contribution de cette hélice est au maximum de 0.7 unité pH. Ainsi, l'élément principal permettant d'exacerber le caractère nucléophile de la cystéine essentielle est la formation de la paire d'ions avec l'His176. L'examen du complexe ternaire II montre que le résidu sérine 149 est positionné de manière différente par rapport au résidu cystéine dans l'enzyme de type sauvage. En effet, la distance entre l'atome d'oxygène O_γ de la chaîne latérale de la Ser149 et l'atome N_{ϵ_2} de l'His176 est de 4,3 Å, alors que la distance entre le S_γ de la chaîne latérale de la Cys149 et l'atome N_{ϵ_2} de l'His176 est de 3,6 Å. Même si on ne sait pas quelle est la position exacte de la Cys149 dans le complexe ternaire, il est clair que la distance entre le O_γ de la Ser149 et l'atome N_{ϵ_2} de l'His176 ne permet pas à cette dernière d'augmenter le caractère nucléophile de la sérine comme dans le cas de l'enzyme sauvage. Ce résultat est en accord avec les études cinétiques (Boschi-Muller & Branlant,

1999) réalisées sur le simple mutant C149S et le double mutant C149S/H176N qui montrent que la présence ou l'absence de His176 n'influe pas sur la nucléophilie du résidu sérine 149.

Par ailleurs, l'attaque du groupement thiolate se fait préférentiellement en dehors du plan du carbone sp^2 pour réduire les interactions défavorables de type coulombienne entre l'oxygène et le soufre. L'analyse du site actif du complexe ternaire II montre que (même si le caractère nucléophile de la Ser149 était suffisant) la chaîne latérale de la Ser149 n'est pas orientée de façon optimale pour une attaque nucléophile sur le carbone C_1 du substrat. En effet, cette chaîne dévie de $17,7^\circ$ par rapport à l'orientation idéale pour une attaque du groupement thiolate sur le substrat en C_1 . De plus, la distance entre l'atome O_γ de la Ser149 et l'atome C_1 du substrat (3,21 Å) est beaucoup trop grande pour permettre une attaque nucléophile efficace de la sérine sur le carbone C_1 du substrat. Comme le mutant Ser149 conserve néanmoins une certaine activité résiduelle, on peut supposer, qu'en solution, des réarrangements locaux doivent se produire dans le site actif suite à la fixation du substrat pour permettre l'acte catalytique.

Discussion sur la stéréosélectivité de substrat :

Les GAPDH présentent une stéréosélectivité marquée pour l'énantiomère D du Glycéraldéhyde-3-phosphate, qui a, elle aussi, fait l'objet de controverses dans la littérature. Par modélisation de l'intermédiaire hémithioacétal dans le site actif de l'enzyme de homard, Moras et *al.* (Moras et al., 1975) avaient proposé que la stéréosélectivité soit due à une interaction entre le groupe hydroxyle en C_2 du substrat et la chaîne latérale de la Ser148. Cette hypothèse avait ensuite été réfutée par Skarzynski et *al.* (1987) qui, à partir de la structure à haute résolution de l'enzyme de *B. stearothermophilus*, observait pour la chaîne latérale de la sérine 148 une orientation différente de celle trouvée par Moras et *al.* (1975). En effet, dans la structure de l'enzyme de *B. stearothermophilus*, une liaison hydrogène est présente entre le groupe OH de la Ser148 et le groupement amidique de la Thr151, semblant exclure l'implication de ce résidu Ser148 dans la stéréosélectivité. Par ailleurs, Duée et *al.* (1996) ont modélisé l'intermédiaire hémithioacétal dans la GAPDH d'*E. coli* et proposé l'existence d'une interaction forte, entre l'oxygène O_5 du groupe hydroxyle en C_2 de l'intermédiaire hémithioacétal modélisé et le groupe NH de Cys149, qui expliquerait cette stéréosélectivité.

Les deux structures des complexes ternaires montrent la présence de l'isomère D dans le site actif, indiquant que les mutants C149A et C149S sont strictement stéréosélectifs. Cette première constatation permet immédiatement de conclure que le groupement thiol de la

Cys149, résidu essentiel de la catalyse, n'est pas impliqué dans ce phénomène de stéréosélectivité. Par ailleurs, dans ces complexes, la chaîne latérale de la Ser148 forme une liaison hydrogène avec le groupement amidique de la Thr151, ce qui exclut définitivement toute contribution de ce résidu à la stéréosélectivité de substrat. De plus, les distances entre l'oxygène du groupe hydroxyle en C₂ du G3P et le groupement amidique du résidu 149, bien qu'un peu longues (de l'ordre de 3.6 Å dans les deux complexes), laissent supposer une interaction faible mais effective entre ces groupements. Par ailleurs, le groupement hydroxyle en C₂ est également en interaction avec une molécule d'eau présente dans les quatre monomères des deux structures. Cette molécule d'eau forme un réseau avec d'autres molécules d'eau et l'atome d'oxygène en 2' du ribose adjacent au nicotinamide du NAD. (figure VI-21). Cette interaction entre le groupement hydroxyle en C₂ et la molécule d'eau Wat1388 contribue vraisemblablement à la stabilisation du groupement hydroxyle.

Nos résultats structuraux confortent donc d'une part l'hypothèse de Duée et *al.* (1996) et apportent d'autre part des éléments nouveaux et une réponse définitive quant à la nature des facteurs structuraux responsables de la stéréosélectivité de substrat.

Discussion sur la position du phosphate du substrat

Deux modèles distincts ont été proposés pour expliquer la contribution des deux sites de reconnaissance anionique à la catalyse.

➤ sur la base des données structurales de la GAPDH de homard, Moras et *al.* (1975) ont proposé une modélisation de l'intermédiaire thiohémiacétal avec le groupement phosphate porté par le carbone C₃ du substrat G3P dans le site Ps. Le phosphate inorganique attaquerait, à partir du site Pi, le carbone C₁ de l'acylenzyme durant l'étape de phosphorylation. Ce premier modèle est soutenu par la plupart des hypothèses formulées durant ces cinq dernières années sur la base de données structurales (RX et RMN) (Cane & Sohng, 1994; Duée et *al.*, 1996; Kim et *al.*, 1995; Song et *al.*, 1999; Souza et *al.*, 1998). La modélisation de l'intermédiaire thiohémiacétal dans le site actif de la GAPDH de *L. mexicana* (Kim et *al.*, 1995) a notamment montré que la conformation où le phosphate du substrat est dans le site Ps était énergiquement la plus favorable.

➤ la structure d'un complexe ternaire GAPDH/NAD/glycidol-3-phosphate résolue par Moody (1984) révèle par contre que le groupement phosphate de l'inhibiteur est

fixé à proximité du site Pi. Sur la base des données structurales de ce complexe ternaire, et considérant le fait que l'attaque du phosphate inorganique ne peut se faire avec une géométrie appropriée qu'à partir du site Pi, l'équipe de Wonacott (Moody, 1984; Skarzynski et al., 1987) a suggéré que le phosphate du substrat se fixe dans un premier temps dans le site Pi. Après la réaction d'oxydation et le remplacement du cofacteur réduit (NADH) par un cofacteur oxydé (NAD⁺), le groupement phosphate porté par le C₃ du substrat migrerait du site Pi vers le site Ps, permettant au phosphate inorganique de venir se positionner dans le site Pi pour l'étape de phosphorylation. Ce modèle avait été en partie conforté par des expériences de mutagenèse dirigée (Corbier et al., 1994).

Il faut noter que dans ces deux modèles, la conformation de l'intermédiaire thiohémiacétal ne diffère que par une rotation autour de la liaison entre les carbones C₁ et C₂ du substrat (Duée et al., 1996). Dans les deux cas, le carbone C₄ de la partie nicotinamide du cofacteur NAD⁺ est bien positionné pour le transfert d'hydrure avec le carbone C₁ du substrat.

Nos résultats structuraux sur les complexes binaires et ternaires nous permettent d'ouvrir une discussion sur le mode de fixation du substrat dans le site actif et d'examiner la validité de ces modèles réactionnels.

Examinons dans un premier temps les résultats obtenus sur les complexes binaires. Bien qu'ayant mené les cristallisations en absence de tout anion compétiteur du phosphate, les complexes binaires obtenus possèdent un ion sulfate lié au site Ps alors que le site Pi est libre de tout anion. Ce résultat ne s'explique que si l'ion sulfate est resté lié au site Ps depuis la première étape de purification et ce, malgré les différentes dialyses, et traduit vraisemblablement le fait que le site Ps présente une affinité plus grande pour les anions que celle du site Pi. Afin de rechercher une explication à cette différence d'affinité, nous avons calculé le potentiel électrostatique à la surface des monomères des complexes ternaires I et II à l'aide du logiciel *GRASP* (Nicholls *et al.*, 1991). Les calculs ont été effectués à partir des atomes de la structure du monomère de l'holoenzyme seul (en ôtant le cofacteur NAD⁺ et le sulfate). Alors que la charge globale des monomères est de -5, la poche du site actif présente un potentiel positif (figure VI-24). En examinant de plus près les potentiels électrostatiques locaux au niveau des sites de reconnaissance anionique, nous pouvons constater que le site Ps possède un potentiel électrostatique positif intense (le potentiel à la surface au niveau de l'Arg231 est de 12,5). Le site Pi, par contre, a un potentiel électrostatique positif beaucoup plus faible (environ 3 autour de la Thr208) (figure VI-25).

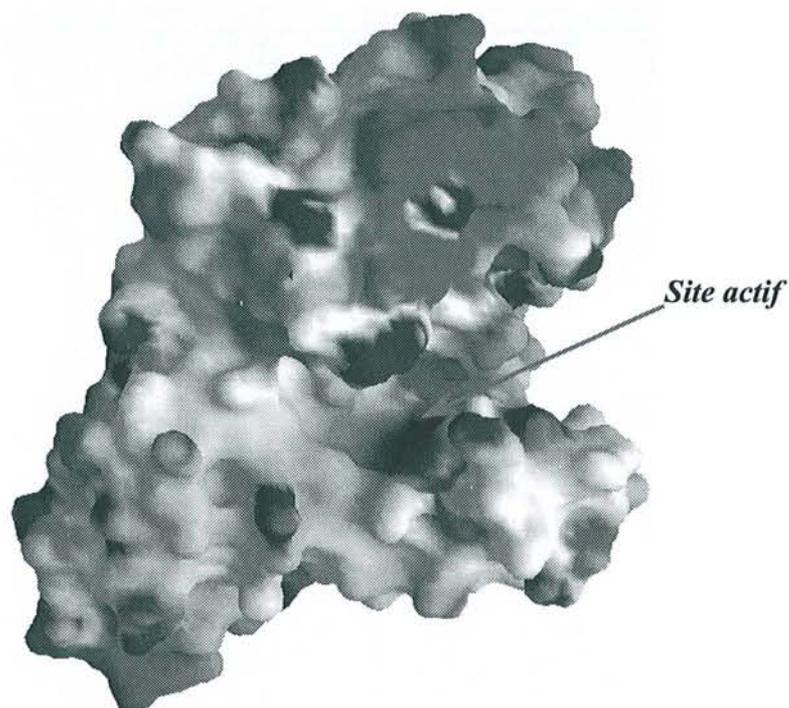


Figure VI- 24 : Surface et potentiel électrostatique d'un monomère de l'holoenzyme de type sauvage. Les couleurs blanc, bleu et rouge représentent respectivement les surfaces de potentiel électrostatique neutre, positif et négatif. Les valeurs utilisées par défaut : la charge (la charge totale) ; la concentration en sel (0,0) ; le diélectrique interne (2,0), et le diélectrique externe (80,0).

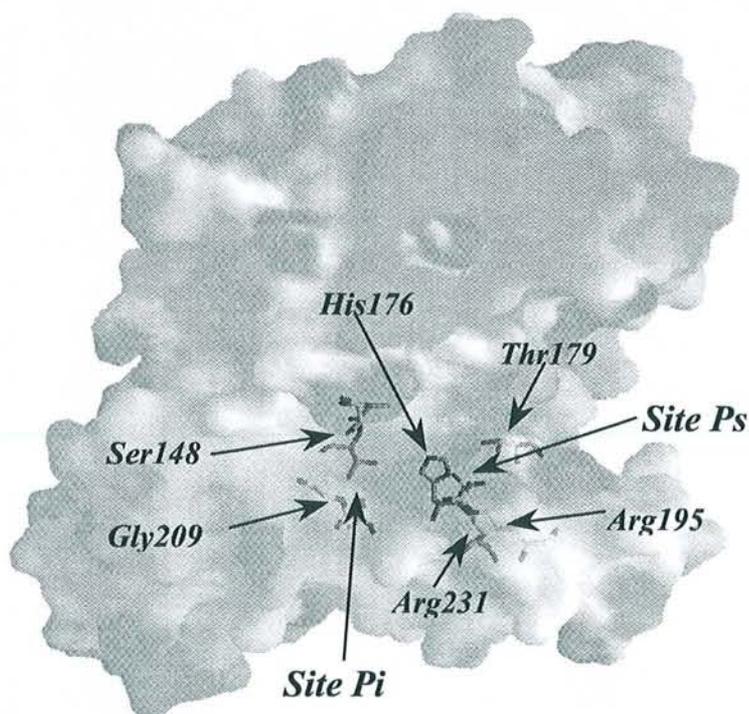


Figure VI- 25 : Potentiel électrostatique sur une surface transparente d'un monomère de l'holoenzyme de type sauvage. Seuls sont représentés les résidus du site actif.

Cette différence de potentiel électrostatique local entre les surfaces des sites de reconnaissance anionique (Ps et Pi) est en accord avec nos résultats cristallographiques et confirme la différence d'affinité de ces deux sites pour les anions.

Il semble donc logique que, durant la première étape de la réaction, le phosphate du substrat se fixe préférentiellement sur le site Ps qui est le plus affin. Effectivement, l'obtention des deux complexes ternaires semble confirmer cette hypothèse puisque dans les deux cas, le groupement phosphate porté par le carbone 3 du substrat est situé dans le site Ps.

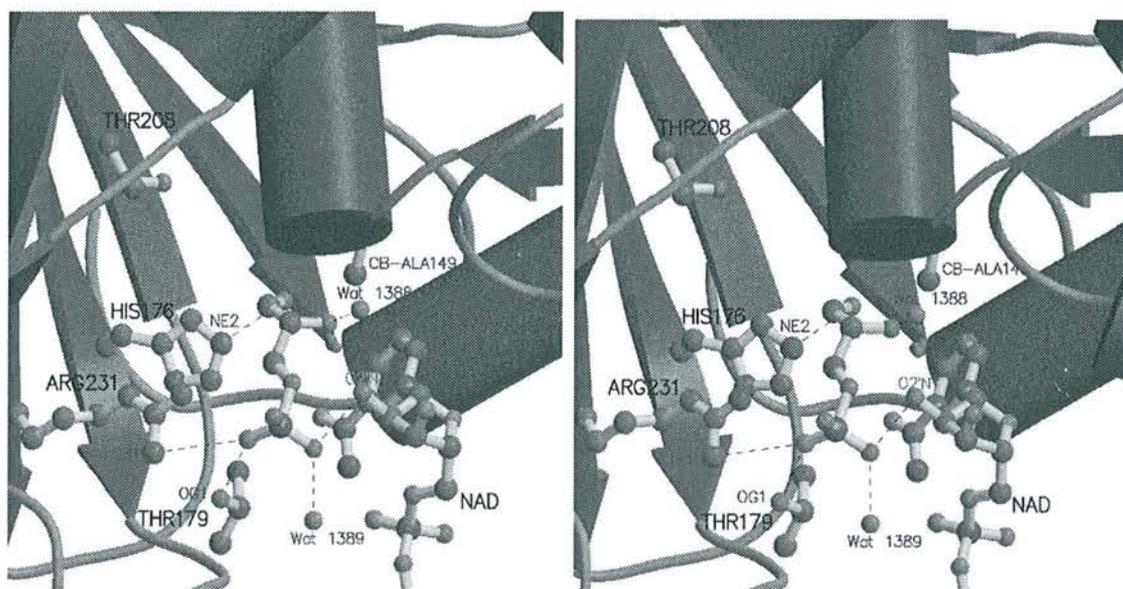
Comment concilier ces résultats avec les données de la littérature et notamment les résultats biochimiques obtenus sur des mutants des sites Pi et Ps et les résultats obtenus par Moody sur le complexe ternaire GAPDH/NAD/glycidol-3-phosphate?

Il convient ici de rappeler que, toujours dans le but d'examiner la contribution des sites Pi et Ps à la catalyse, tous les résidus appartenant à ces sites avaient été remplacés par mutagenèse dirigée et les propriétés des mutants avaient été analysées par des cinétiques à l'état stationnaire ou préstationnaire. Ces études avaient mis en évidence le fait que toute mutation d'un résidu du site Pi entraîne un ralentissement important de l'étape d'oxydoréduction, alors que la vitesse de cette étape demeure inchangée par rapport à l'enzyme de type sauvage pour les mutants du site Ps (Michels *et al.*, 1996). Cette constatation avait amené les auteurs à conclure que le phosphate du substrat interagissait vraisemblablement avec le site Pi lors de l'étape d'oxydoréduction, ce qui semblait en accord avec l'hypothèse de l'équipe de Wonacott et les résultats structuraux avec le glycidol-3-phosphate.

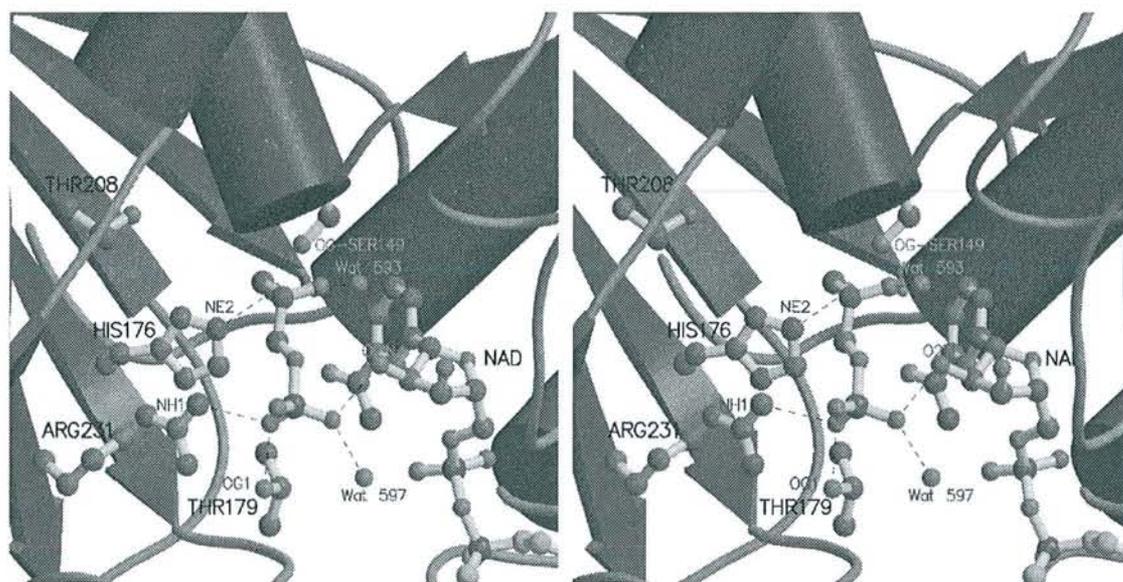
Les résultats que nous avons obtenus sur les complexes ternaires sont donc en contradiction apparente avec les études présentées ci-dessus. Si nous analysons de façon plus approfondie l'ensemble des données, nous avons, par rapport à Moody, l'avantage d'avoir travaillé avec le substrat physiologique de l'enzyme. Dans les deux structures de complexes ternaires, le substrat possède la même conformation, et son groupement phosphate donne les mêmes interactions que celles observées pour l'ion sulfate présent dans le site Ps de l'enzyme de type sauvage (figure VI-26). L'ensemble de ces éléments nous permet de supposer raisonnablement que cette position puisse être celle que le substrat adopte durant la première étape de la réaction. Si tel est le cas, une explication plausible concernant le positionnement différent pour le phosphate du glycidol-3-phosphate serait liée au fait que ce dernier ne possède pas d'atome oxygène en C₁. Ainsi, la liaison hydrogène entre le N_{ε2} de l'His176 et le groupement hydroxyle en C₁, qui est présente dans les deux structures ternaires I et II et qui

semble importante dans la fixation du substrat physiologique, est absente dans le glycidol-3-phosphate. L'absence de cette liaison pourrait être à l'origine d'un mode de liaison différent.

Cependant, il ne faut pas oublier que dans les deux complexes ternaires que nous avons obtenus, le substrat n'est pas lié de façon covalente à l'enzyme, et par conséquent, ces structures ne sont pas non plus exactement représentatives des intermédiaires thiohémiacétal ou thioester mais plutôt du stade antérieur de reconnaissance enzyme / substrat. A partir de là, nous pouvons simplement conclure qu'au tout premier stade de la réaction, le groupement phosphate en C₃ du substrat interagit très probablement avec le site Ps, mais nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que l'attaque nucléophile du résidu essentiel et la formation de la liaison covalente entre l'enzyme et le substrat puisse entraîner un basculement du groupement phosphate du site Ps vers le site Pi. Toutefois, à l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucun argument en faveur de cette hypothèse qui présenterait néanmoins l'avantage de pouvoir concilier nos résultats avec ceux de l'équipe de Wonacott et ceux des études biochimiques. Si cela s'avérait techniquement réalisable, il serait intéressant de pouvoir réaliser la détermination d'un complexe ternaire avec une enzyme pour laquelle l'étape d'acylation est très rapide mais l'étape de déacylation très lente, de façon à pouvoir isoler une population homogène de complexes covalents.



(a)



(b)

Figure VI- 26 : Vue stéréoscopique montrant le positionnement du substrat dans le site actif des complexes ternaires I et II.

CONCLUSION

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de la GAPDH et de vérifier les modèles hypothétiques proposés sur la base des études cinétiques et structurales antérieures, nous avons tenté d'apporter des évidences structurales directes, en étudiant le site actif modélisé en présence de son substrat physiologique. Afin de bloquer la réaction catalytique et de stabiliser le complexe enzyme substrat et/ou le premier intermédiaire réactionnel, la nature du nucléophile essentiel impliqué dans la catalyse enzymatique a été modifiée par ingénierie protéique par l'équipe du Pr Branlant. Pour cela, la cystéine 149 a été remplacée par un résidu non nucléophile, en l'occurrence une alanine, et par un résidu moins nucléophile qu'une cystéine, une sérine. Le mutant (C149A) ainsi obtenu est inactif et le mutant (C149S) n'est que très faiblement actif.

Des cristaux de ces deux mutants ont été obtenus dans des conditions originales, exemptes de tout anion. Ces nouvelles conditions de cristallisations ont conduit à de nouveaux empilements cristallins. Les collectes des données ont été réalisées à basse température. La cryocrystallographie a permis de contourner les problèmes de dégradations des cristaux sous les rayons X et de maximiser la durée de vie des complexes ternaires. La détermination des structures des complexes binaires et ternaires de ces deux mutants a permis d'apporter des réponses à certaines questions jusqu'ici sujettes à controverses.

L'analyse des structures des complexes binaires met en évidence des sites Pi libres de tout anion. Par contre, les sites Ps restent occupés par un anion sulfate issu probablement de la purification. Ceci montre que le site Ps a une meilleure affinité que le site Pi vis à vis des anions. Ce résultat est en accord avec les hypothèses émises par Chakrabarti (1993) et Copley & Barton (1994) qui postulent que la présence d'une arginine dans un site de fixation anionique a pour effet de renforcer l'affinité de ce site pour un sulfate ou un phosphate. En effet, l'analyse des acides aminés impliqués dans la formation des sites Pi et Ps de la GAPDH montre une implication directe d'une arginine dans le site Ps (Arg231), inexistante dans le site Pi. Cette différence d'affinité peut s'expliquer par le fait que les deux sites de reconnaissance anionique présentent une différence importante dans leur potentiel électrostatiques locaux : en effet, le potentiel électrostatique positif du site Ps est de 12 environ alors que celui du site Pi n'est que de 3.

La boucle 205-210 qui intervient dans la formation du site Pi, présente une certaine liberté conformationnelle dans les deux structures des complexes binaires. Ce résultat conforte les observations de Kim et al., (1995) et Song et al., (1999), qui ont émis l'hypothèse que cette liberté conformationnelle puisse favoriser le positionnement du phosphate inorganique pour l'étape de phosphorylation. Dans cette hypothèse, nous nous attendions à

retrouver, dans les complexes ternaires, un déplacement de la boucle d'une amplitude au moins égale à celle observée dans les complexes binaires. Or, il s'avère qu'en présence de substrat, le déplacement de la boucle 205-210 est à peine significatif. Ce résultat remet donc en question la contribution que pourrait avoir le déplacement de cette boucle à la formation d'un site Pi fonctionnel.

L'analyse des structures ternaires confirme la plus grande affinité du site Ps pour les anions. En effet, l'interprétation des cartes de densité électronique différence révèle clairement, dans les deux structures ternaires, un pic de densité positif qui correspond sans ambiguïté au substrat *D-G3P*, le groupement phosphate en C₃ du substrat se plaçant dans le site Ps. La fixation du substrat dans le site actif des quatre sous-unités du tétramère est symétrique et il adopte la même conformation dans les deux structures des complexes ternaires. La fixation non covalente du substrat dans le site catalytique des deux complexes est vraisemblablement représentative du positionnement du substrat dans le site actif de l'enzyme sauvage, au stade de la formation du complexe michaelien. Le fait que le mutant Ser149 présente une affinité apparente pour le G3P inchangée par rapport à l'enzyme sauvage laisse supposer un positionnement équivalent du substrat dans le site actif de la protéine sauvage et de la protéine mutée. Les résultats structuraux sur ces deux complexes semblent donc, a priori, en accord avec l'hypothèse de Moras et al. (1975) qui suggère que le site Ps est bien le site du phosphate en C₃ du substrat durant l'étape d'oxydoréduction. Cependant, l'absence de lien covalent ne nous permet pas de lever l'indétermination liée au positionnement du groupement phosphate du substrat lors de la formation des intermédiaires hémithioacétal et thioacylenzyme. Le fait que le complexe obtenu soit de nature non covalente dans le cas du mutant C149S corrobore les études cinétiques de Boschi-Muller et Branlant (1999) qui mettent en évidence une perte importante de l'efficacité enzymatique suite à la mutation ainsi qu'un changement d'étape limitante, cette dernière étant associée à l'étape d'oxydoréduction dans le cas du mutant C149S.

La très faible réactivité du mutant C149S pouvait s'expliquer soit par une attaque non efficace de la sérine 149 sur la fonction aldéhyde du G3P, due au faible caractère nucléophile de la sérine, soit à un mauvais positionnement du groupement hydroxyle de la sérine par rapport à la fonction aldéhydique du substrat. L'examen du complexe ternaire II montre effectivement que l'His176 ne permet pas d'augmenter la nucléophilie de la Ser149 via la formation d'une paire d'ions comme dans le cas de l'enzyme sauvage. En effet, la distance entre l'atome d'oxygène O_γ de la chaîne latérale de la Ser149 et l'atome N_{ε2} de l'His176 est de 4,3 Å, alors

que la distance entre le S_{γ} de la chaîne latérale de la Cys149 et l'atome $N_{\epsilon 2}$ de l'His176 est de 3,6 Å. Ce résultat est confirmé expérimentalement par les études cinétiques (Boschi-Muller & Branlant, 1999) réalisées sur le double mutant C149S/H176N qui montrent que la présence ou l'absence de l'His176 n'influe pas sur la nucléophilie du résidu sérine 149. En ce qui concerne la position de la chaîne latérale de la Ser149 par rapport au carbone aldéhydique, nous avons montré que l'orientation de cette chaîne latérale n'était pas optimale pour l'attaque nucléophile, mais surtout, que la distance $O_{\gamma}-C_1$ était beaucoup trop grande pour permettre une attaque efficace sans réarrangement du complexe ternaire. L'ensemble de ces raisons permet d'étayer, au niveau structural, la faible efficacité catalytique du mutant Ser149.

Les complexes ternaires que nous avons obtenus constituent la première structure tridimensionnelle d'une GAPDH en complexe avec son substrat physiologique. L'analyse de ces complexes a permis d'apporter des informations quant aux interactions enzyme-substrat dans un stade mimant vraisemblablement le complexe de reconnaissance michaelien. Des réponses claires ont pu être apportées à certaines questions, comme par exemple les facteurs moléculaires responsables de la stéréosélectivité que l'enzyme présente vis-à-vis de l'énantiomère D du G3P. Cependant, de nombreuses questions restent encore posées, notamment en ce qui concerne le rôle de la boucle 205-210 dans le mécanisme catalytique de l'enzyme et les conséquences éventuelles de la formation de la liaison covalente sur le positionnement du phosphate en C_3 du substrat. Seule une détermination structurale d'un complexe ternaire avec formation d'un intermédiaire thioacylenzyme pourrait répondre de manière définitive à ces questions. Sachant qu'à pH 7, la déacylation est lente et que la condition de cristallisation du mutant C149S est à pH 7,5 et ne contient pas de phosphate, une idée serait de tenter la diffusion du G3P dans des cristaux de l'enzyme de type sauvage obtenu dans cette condition particulière.

ANNEXES

Annexe I : Les interactions intra et inter-sous-unités de la GAPDH de B. stearothermophilus.

Interactions intra sous-unités de la GAPDH de B. stearothermophilus

Les ponts salins formés au sein du même tétramère sont répertoriés dans le tableau suivant :

<i>Donneur de H</i>		<i>Accepteur de H</i>	<i>Monomères</i>				
			<i>O (Å)</i>	<i>P (Å)</i>	<i>Q (Å)</i>	<i>R (Å)</i>	
<i>Domaine de fixation de NAD⁺</i>							
<i>ARG 10</i>	<i>NE</i>	<i>... GLU 314</i>	<i>OE2</i>	2,87	2,82	2,89	2,80
<i>ARG 10</i>	<i>NH1</i>	<i>... ASP 47</i>	<i>OD1</i>	2,89	2,84	3,00	2,90
<i>ARG 10</i>	<i>NH2</i>	<i>... ASP 47</i>	<i>OD1</i>	3,23	3,18	3,19	3,05
<i>ARG 10</i>	<i>NH2</i>	<i>... ASP 47</i>	<i>OD2</i>	2,90	2,88	2,94	2,83
<i>ARG 10</i>	<i>NH2</i>	<i>... GLU 314</i>	<i>OE1</i>	2,87	2,91	3,00	2,84
<i>ARG 102</i>	<i>NE</i>	<i>... ASP 125</i>	<i>OD1</i>	2,71	***	2,87	2,70
<i>ARG 102</i>	<i>NH2</i>	<i>... ASP 125</i>	<i>OD2</i>	2,85	3,18	3,28	2,83
<i>Domaine catalytique</i>							
<i>ARG 195</i>	<i>NH1</i>	<i>... ASP 181</i>	<i>OD1</i>	2,66	2,92	2,72	2,89
<i>ARG 320</i>	<i>NE</i>	<i>... ASP 323</i>	<i>OD2</i>	3,01	2,73	2,84	2,81
<i>LYS 306</i>	<i>NZ</i>	<i>... ASP 241</i>	<i>OD1</i>	3,10	3,03	3,03	2,85

Interactions inter sous-unités de la GAPDH de B. stearothermophilus

Les interactions entre les monomères suivant les axes P, Q et R sont conservés dans toutes les GAPDH thermophiles (Skarzynski et al., 1987). Ces derniers sont répertoriés dans le tableau suivant :

<i>Interface suivant l'axe P</i>	<i>Distance</i>	
	<i>O-P</i>	<i>Q-R</i>
NH2-Arg169 ... OE1-Glu245	2,74	3,12
NE-Arg169 ... OE2-Glu245	2,98	2,72
OG1-Thr173 ... OD2-Asp241	2,58	2,52
OG1-Thr173 ... NZ-Lys306	2,78	2,75
NH2-Arg194 ... OD1-Asp293	2,81	2,80
NH1-Arg194 ... O-Leu278	2,74	2,49
NH1-Arg194 ... OD2-asp293	2,93	3,14
NH2-Arg197 ... OD2-Asp282	2,96	2,85
NH1-Arg197 ... OD1-Asp282	2,66	2,65
OE1-Glu201 ... NH2-Arg281	2,84	-
O-Glu201 ... NE-Arg281	2,96	-
OG-Ser202 ... N-Arg281	3,19	3,12
N-Ile203 ... OG-Ser280	2,86	3,05
O-Ile203 ... N-Ser280	3,06	3,01
OD2-Asp241 ... OG1-Thr173	2,63	2,76
OE2-Glu245 ... NE-Arg169	2,79	2,79
OE1-Glu245 ... NH2-Arg169	2,66	2,88
O-Leu278 ... NH1-Arg194	2,84	2,71
N-Ser280 ... O-Ile203	3,01	3,12
OG- Ser280 ... N-Ile203	3,02	2,77
N-Arg281 ... OG-Ser202	3,11	3,29
NH2-Arg281 ... OE1-Glu201	-	2,97
NE-Arg281 ... O-Glu201	-	2,85
OD2-Asp282 ... NH2-Arg197	2,74	2,65

OD1-Asp282 ... NH1-Arg197	2,70	2,61
(suite du tableau des interactions inter sous-unités)		
	<i>Distance</i>	
<i>Interface suivant l'axe P</i>	<i>O-P</i>	<i>Q-R</i>
OD2-Asp293 ... NH1-Arg194	2,98	2,86
OD1-Asp293 ... NH2-Arg194	2,79	2,73
NZ-Lys306 ... OG1-Thr173	2,83	3,00
<i>Interface suivant l'axe Q</i>	<i>O-Q</i>	<i>P-R</i>
NE-Arg52 ... O-Asp282	3,20	3,14
OE2-Glu276 ... NZ-Lys45	3,15	—
OE2-Glu276 ... OH-Tyr46	—	2,80
O-Asp282 ... NE-Arg52	2,79	3,05
<i>Interface suivant l'axe R</i>	<i>O-R</i>	<i>P-Q</i>
NH2-Arg13 ... O-Asp186	2,84	2,90
N-Ser48 ... OD2-Asp186	3,03	3,04
OG-Ser48 ... OD1-Asp186	2,72	2,79
ND2-Asn180 ... O-Leu185	2,93	3,05
OD1-Asn180 ... N-Leu185	3,01	3,02
N-Leu185 ... OD1-Asn180	3,09	2,97
O-Leu185 ... ND2-Asn180	3,18	2,87
OD2-Asp186 ... N-Ser48	2,86	2,98
OD1-Asp186 ... OG-Ser48	2,66	2,72
O-Asp186 ... NH2-Arg13	2,99	2,77

Annexe II : Présentation des groupes d'espace $P3_121$ et $C2$

I. Pages de la table internationale du groupe d'espace $P3_121$

$P3_121$

D_3^4

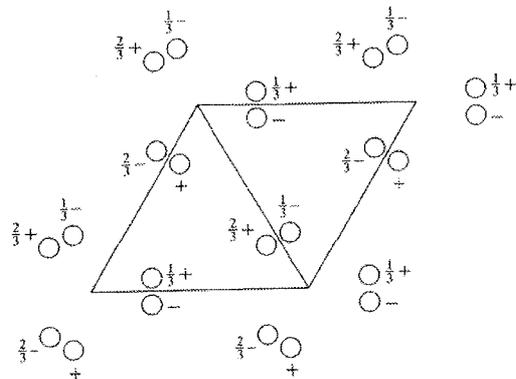
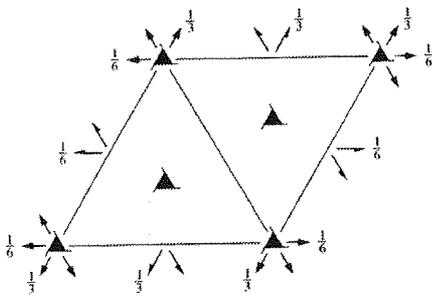
3 2 1

Trigonal

No. 152

$P3_121$

Patterson symmetry $P\bar{3}m1$



Origin on $2[110]$ at $3_1(1,1,2)1$

Asymmetric unit $0 \leq x \leq 1; 0 \leq y \leq 1; 0 \leq z \leq \frac{1}{2}$
Vertices $0,0,0$ $1,0,0$ $1,1,0$ $0,1,0$
 $0,0,\frac{1}{2}$ $1,0,\frac{1}{2}$ $1,1,\frac{1}{2}$ $0,1,\frac{1}{2}$

Symmetry operations

- | | | |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| (1) 1 | (2) $3^+(0,0,\frac{1}{3})$ $0,0,z$ | (3) $3^-(0,0,\frac{2}{3})$ $0,0,z$ |
| (4) 2 $x,x,0$ | (5) 2 $x,0,\frac{1}{2}$ | (6) 2 $0,y,\frac{1}{2}$ |

CONTINUED

No. 152

 $P3_121$ Generators selected (1); $t(1,0,0)$; $t(0,1,0)$; $t(0,0,1)$; (2); (4)

Positions

Multiplicity,
Wyckoff letter,
Site symmetry

Coordinates

Reflection conditions

6	<i>c</i>	1	(1) x, y, z	(2) $\bar{y}, x-y, z+\frac{1}{2}$	(3) $\bar{x}+y, \bar{x}, z+\frac{1}{2}$
			(4) y, x, \bar{z}	(5) $x-y, \bar{y}, \bar{z}+\frac{1}{2}$	(6) $\bar{x}, \bar{x}+y, \bar{z}+\frac{1}{2}$

General:

 $000l : l = 3n$

Special: no extra conditions

3 *b* .2. $x, 0, \frac{1}{2}$ $0, x, \frac{1}{2}$ $\bar{x}, \bar{x}, \frac{1}{2}$ 3 *a* .2. $x, 0, \frac{1}{2}$ $0, x, \frac{1}{2}$ $\bar{x}, \bar{x}, 0$

Symmetry of special projections

Along [001] $p31m$ $a' = a$ $b' = b$ Origin at $0, 0, z$ Along [100] $p2$ $a' = \frac{1}{2}(a+2b)$ $b' = c$ Origin at $x, 0, \frac{1}{2}$ Along [210] $p11m$ $a' = \frac{1}{2}b$ $b' = c$ Origin at $x, \frac{1}{2}x, \frac{1}{2}$

Maximal non-isomorphic subgroups

I [2] $P3_111(P3_1)$ 1; 2; 3
 [3] $P121(C2)$ 1; 4
 [3] $P121(C2)$ 1; 5
 [3] $P121(C2)$ 1; 6

IIa none

IIb [3] $H3_121(a' = 3a, b' = 3b)(P3_112)$

Maximal isomorphic subgroups of lowest index

IIc [2] $P3_221(c' = 2c)$; [7] $P3_121(c' = 7c)$; [4] $P3_121(a' = 2a, b' = 2b)$

Minimal non-isomorphic supergroups

I [2] $P6_122$; [2] $P6_422$ II [3] $H3_121(P3_112)$; [3] $R32$ (obverse); [3] $R32$ (reverse); [3] $P321(3c' = c)$

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
 BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
 Rue du Jardin Botanique
 54600 VILLERS-LES-NANCY

II. Pages de la table internationale du groupe d'espace C2

C2

C₂³

2

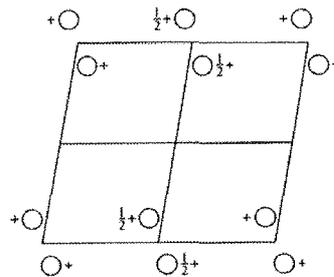
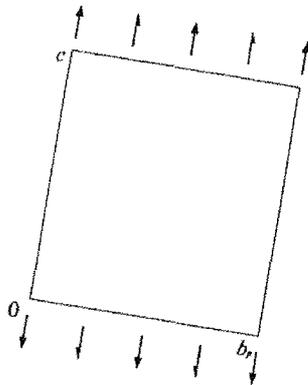
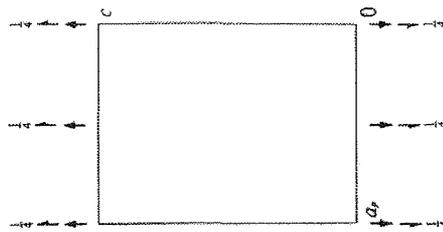
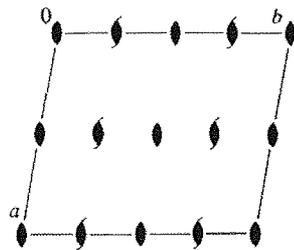
Monoclinic

No. 5

A 112

Patterson symmetry A 112/m

UNIQUE AXIS *c*, CELL CHOICE 1



Origin on 2

Asymmetric unit $0 \leq x \leq 1; 0 \leq y \leq \frac{1}{2}; 0 \leq z \leq \frac{1}{2}$

Symmetry operations

For (0,0,0)+ set

(1) 1 (2) 2 0,0,z

For (0,½,½)+ set

(1) 1 (2) 2(0,0,½) 0,½,z

CONTINUED

No. 5

C2

Generators selected (1): $t(1,0,0)$; $t(0,1,0)$; $t(0,0,1)$; $t(0,\frac{1}{2},\frac{1}{2})$; (2)

Positions

Multiplicity,
Wyckoff letter,
Site symmetry

Coordinates

(0,0,0)+ (0, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{2}$)+4 c 1 (1) x,y,z (2) \bar{x},\bar{y},z

Reflection conditions

General:

$$hkl: k+l=2n$$

$$hk0: k=2n$$

$$0kl: k+l=2n$$

$$h0l: l=2n$$

$$00l: l=2n$$

$$0k0: k=2n$$

Special: no extra conditions

2 b 2 $\frac{1}{2},0,z$

2 a 2 0,0,z

Symmetry of special projections

Along [001] $p2$

$$a'=a \quad b'=\frac{1}{2}b$$

Origin at 0,0,z

Along [100] $c1m1$

$$a'=b_p \quad b'=c$$

Origin at $x,0,0$ Along [010] $p11m$

$$a'=\frac{1}{2}c \quad b'=a_p$$

Origin at 0,y,0

Maximal non-isomorphic subgroups

I [2]A 1 (P 1) 1+

IIa [2]P 1 1 2 (P 2) 1; 2

[2]P 1 1 2₁ (P 2₁) 1; 2+(0, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{2}$)

IIb none

Maximal isomorphic subgroups of lowest index

IIc [3]A 1 1 2 ($c'=3c$)(C 2); [2]A 1 1 2 ($a'=2a$ or $a'=2a, b'=2a+b$)(C 2)

Minimal non-isomorphic supergroups

I [2]C 2/m; [2]C 2/c; [2]C 2 2 2₁; [2]C 2 2 2; [2]F 2 2 2; [2]I 2 2 2; [2]I 2, 2, 2₁; [2]A m m 2; [2]A b m 2; [2]A m a 2;
[2]A b a 2; [2]F m m 2; [2]F d d 2; [2]I m m 2; [2]I b a 2; [2]I m a 2; [2]I 4; [2]I 4₁; [2]I 4₂; [3]P 3 1 2; [3]P 3 2 1;
[3]P 3₁ 1 2; [3]P 3₂ 1 2; [3]P 3₂ 2 1; [3]R 3 2II [2]P 1 1 2 ($2b'=b, 2c'=c$)(P 2)

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie



- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. & Kohda, D. (2000). Structural Basis of Presequence Recognition by the Mitochondrial Protein Import Receptor Tom20. *Cell (Cambridge, Mass.)* **100(5)**(Mar. 3), 551-560.
- Harveyi. Structural Comparison with Nad⁺ Dependent Enzymes.
- Amemiya, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, H., Ueno, Y. & Miyahara, J. (1987). Laser-stimulated luminescence used to measure x-ray diffraction of a contracting striated muscle. *Science* **237(4811)**(Jul. 10), 164-168.
- Andersen, G. R., Thirup, S., Nyborg, J., Dolmer, K., Jacobsen, L. & Sottrup-Jensen, L. (1994). Low-resolution X-ray diffraction data obtained from hexagonal crystals of methylamine-treated alpha2-macroglobulin. *Acta Cryst.* **D50**(May), 298-301.
- Angell, C. A. & Tucker, J. C. (1980). No title. *J. Phys. Chem.* **84**, 268-272.
- Armstrong, J. M. & Trentham, D. R. (1976). The reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate with thiols and the holoenzyme of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and of inorganic phosphate with the acyl-holoenzyme. *Biochem. J.* **159(3)**(Dec. 1), 513-527.



- Baker, P. J., Britton, K. L., Engel, P. C., Farrants, G. W., Lilley, K. S., Rice, D. W. & Stillman, T. J. (1992). Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. *Proteins* **12**, 75-86.
- Benner, S. A., Glasfeld, A. & Piccirilli, J. A. (1989). Stereospecificity in enzymology : its place in evolution. In *Topics in Stereochemistry* (Eliel, E. L. & Wilen, S. H., eds.), pp. 127-207. John Wiley and Sons, New York.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242.

- Berni, R., Mozzarelli, A., Rossi, G. L., Bolognesi, M. & Oberti, R. (1979). Crystallographic symmetry and coenzyme binding properties of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the tail muscle of *Palinurus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* **254**, 8004-8006.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Jr, Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank : A computer-based archival-file for Macromolecular Structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542.
- Biesecker, G., Harris, J. I., Thierry, J. C., Walker, J. E. & Wonacott, A. J. (1977). Sequence and structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature* **266**, 328-333.
- Bishop, W. H. & Richards, F. M. (1968). Properties of liquids in small pores. Rates of diffusion of some solutes in cross-linked crystals of beta-lactoglobulin. *J. Mol. Biol.* **38(3)**, 315-328.
- Blake, C. C. F. & Philips, D. C. (1962). *Symposium of the International Atomic Energy, Vienna, Austria*.
- Bloch, W., MacQuarrie, R. A. & Bernhard, S. A. (1971). The nucleotide and acyl group content of native rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **246(3)**(Feb. 10), 780-790.
- Bode, J., Blumenstein, M. & Raftery, M. A. (1975a). Nonidentical alkylation sites in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **14(6)**(Mar. 25), 1146-1152.
- Bode, J., Blumenstein, M. & Raftery, M. A. (1975b). ¹⁹F nuclear magnetic resonance studies of structure and function relationships in trifluoroacetylated rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **14(6)**(Mar(25)), 1153-1160.
- Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (1999). The active site of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is not designed to increase the nucleophilicity of a serine residue. *Arch. Biochem. Biophys.* **363(2)**(Mar 15;), 259-266.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G. & Hamilton, I. R. (1995). Sequence, expression, and function of the the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **177**, 2622-2727.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371(6498)**(Oct. 13), 578-586.

- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364(6432)**(Jul 1), 33-39.
- Brünger, A. T. (1992). *X-PLOR Manual, version 3.1*, Yale University, Newhaven.
- Brünger, A. T., Adams, P. D. & Rice, L. M. (1997). New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR. *Structure* **5(3)**(Mar. 15), 325-336.
- Buehner, M., Ford, G. C., Moras, D., Olsen, K. W. & Rossmann, M. G. (1974). Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **90**, 25-49.
- Byers, L. D. (1977). Criteria for evaluating enzymic rate enhancements. The case of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **99(12)**(Jun. 8), 4146-4149.

C

- Campbell, J. W., Duée, E., Hodgson, G., Mercer, W. D., Stammers, D. K., Wendell, P. L., Muirhead, H. & Watson, H. C. (1971). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*
- Cane, D. E. & Sohng, J. K. (1994). Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone. 2. Identification of the site of alkylation by tetrahydropentalenolactone. *Biochemistry* **33(21)**(May 31), 6524-6530.
- Canellas, P. F. & Cleland, W. W. (1991). Carbon-13 and deuterium isotope effects on the reaction catalyzed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **30(36)**(Sep. 10), 8871-8876.
- Castellano, E. E., Oliva, G. & Navaza, J. (1992). Fast rigid-body refinement for molecular-replacement techniques. *J. Appl. Cryst.* **25(2)**(April), 281-284.
- CCP4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography Number 4 Collaborative Computational Project. *Acta Cryst.* **D50(5)**(September), 760-763.
- Cerff, R. (1978). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapsis alba* L. NAD(P)-induced conformation changes of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **82**, 45-53.
- Chakrabarti, P. (1993). Anion binding sites in protein structures. *J. Mol. Biol.* **234**, 463-482.
- Charron, C., Talfournier, F., Isupov, M. N., Branlant, G., Littlechild, J. A., Vitoux, B. & Aubry, A. (1999). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55 (Pt 7)**(Jul.), 1353-1355.

- Chen, C. C. & Herzberg, O. (1992). Inhibition of beta-lactamase by clavulanate. Trapped intermediates in cryocrystallographic studies. *J. Mol. Biol.* **224(4)**(Apr. 20), 1103-1113.
- Cheng, Y. G. & Chasteen, N. D. (1991). Role of phosphate in initial iron deposition in apoferritin. *Biochemistry* **30(11)**(Mar. 19), 2947-2953.
- Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. & Aubry, A. (1999). Apo and Holo Crystal Structures of an NADp-Dependent Aldehyde Dehydrogenase from *Streptococcus Mutans*. *J. Mol. Biol.* **290(1)**(Jul. 2), 161-173.
- Coggle, E. (1973). Biological Effects of Radiation. Wykeham Publications, London.
- Copley, R. R. & Barton, G. J. (1994). A structural analysis of phosphate and sulphate binding sites in proteins. Estimation of propensities for binding and conservation of phosphate binding sites. *J. Mol. Biol.* **242(4)**(Sep. 30), 321-329.
- Corbier, C., Clermont, S., Billard, P., Skarzynski, T., Branlant, C., Wonacott, A. & Branlant, G. (1990a). Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **29**, 7101-7106.
- Corbier, C., Michels, S., Wonacott, A. J. & Branlant, G. (1994). Characterization of the two anion-recognition sites of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* by site-directed mutagenesis and chemical modification. *Biochemistry* **33**, 3260-3265.
- Corbier, C., Mougin, A., Mely, Y., Adolph, H. W., Zeppezauer, M., Gerard, D., Wonacott, A. & Branlant, G. (1990b). The nicotinamide subsite of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by site-directed mutagenesis. *Biochimie* **72**, 545-554.
- Creighton, D. J. & Murphy, N. S. R. K. (1990). . In *The Enzymes* (Sigman, D. S. & Boyer, P. D. E., eds.), Vol. 19, pp. 323-421. Academic Press, San Diego.
- Crowther, R. A. (1972). The fast rotation function. In *The Molecular Replacement Method* (Rossmann, M. G., ed.), pp. 173-178. Gordon & Breach Editors.
- Crowther, R. A. & Blow, D. M. (1967). A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Crystallographica* **23**, 544-548.

D

- Dauter, Z., Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. (1995). Proteins at atomic resolution. *Current Opinion in Structural Biology* **5(6)**(Dec.), 784-790.

- Davies, K. J. (1987a). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* **262(20)**(Jul 15), 9895-9901.
- Davies, K. J. & Delsignore, M. E. (1987c). Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **262(20)**(Jul. 15), 9908-9913.
- Davies, K. J., Delsignore, M. E. & Lin, S. W. (1987b). Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* **262(20)**(Jul. 15), 9902-9907.
- Davies, K. J., Lin, S. W. & Pacifici, R. E. (1987d). Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* **262(20)**(Jul. 15), 9914-9920.
- Day, M. W., Hsu, B. T., Joshua-Tor, L., Park, J. B., Zhou, Z. H., Adams, M. W. & Rees, D. C. (1992). X-ray crystal structures of the oxidized and reduced forms of the rubredoxin from the marine hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci.* **1(11)**(Nov.), 1494-1507.
- Devedjiev, Y., Popov, A. N., Ivanova, V. & Atanasov, B. (1994). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the complex of pig muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with o-phenanthroline. *Crystallography Reports* **39**, 665-666.
- Dewan, J. C. & Tilton, R. F. (1987). Greatly reduced radiation damage in ribonuclease crystals mounted on glass fibers. *J. Appl. Cryst.* **20**, 130-132.
- Ding, X., Rasmussen, B. F., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1994). Direct structural observation of an acyl-enzyme intermediate in the hydrolysis of an ester substrate by elastase. *Biochemistry* **33(31)**(Aug. 9), 9285-9293.
- Douzou, P. & Petsko, G. A. (1984). Proteins at work: "stop-action" pictures at subzero temperatures. *Adv. Protein Chem.* **36**, 245-361.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1992). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins : A Practical Approach* (Hames, B. D., Ed.). 1 vols, Oxford University Press.
- Duée, E., Olivier-Deyris, L., Fanchon, E., Corbier, C., Branlant, G. & Dideberg, O. (1996). Comparison of the structures of wild-type and a N313T mutant of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases: Implication for NAD binding and cooperativity. *J. Mol. Biol.* **257**, 814-838.
- Duggleby, R. G. & Dennis, D. T. (1974a). Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Effect of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds on the enzyme-catalyzed arsenolysis of 1,3-diphosphoglyceric acid. *J. Biol. Chem.* **249(1)**(Jan. 10), 175-181.

- Duggleby, R. G. & Dennis, D. T. (1974b). Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Assay and steady state kinetics. *J. Biol. Chem.* **249**(1)(Jan. 10), 167-174.

E

- Eyschen, J., Vitoux, B., Marraud, M., Cung, M. T. & Branlant, G. (1999). Engineered glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds the anti conformation of NAD⁺ nicotinamide but does not experience A-specific hydride transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* **364**(2)(Apr. 15), 219-227.

F

- Fabry, S. & Hensel, R. (1988). Primary structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deduced from the nucleotide sequence of the thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*. *Gene* **64**(2)(Apr. 29), 189-197.
- Fabry, S., Lehmacher, A., Bode, W. & Hensel, R. (1988). Expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the extremely thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus* in *E. coli*. *FEBS lett.* **237**, 213-217.
- Ferri, G., Comerio, G., Iaradola, P., Zapponi, M. C. & Speranza, M. L. (1978). Subunit structure and activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **522**, 19-31.
- Filman, D. J., Bolin, J. T., Matthews, D. A. & Kraut, J. (1982). Crystal structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. II.Environment of bound NADPH and implications for catalysis. *J. Biol. Chem.* **257**, 13663-13672.
- Fink, A. L. (1976). Cryoenzymology: the use of sub-zero temperatures and fluid solutions in the study of enzyme mechanisms. *J. Theor. Biol.* **61**(2)(Sep. 21), 419-45.
- Fink, A. L. & Petsko, G. A. (1981). X-ray cryoenzymology. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **52**, 177-246.
- Fothergill-Gilmore, L. A. & Michels, P. A. M. (1993). Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **59**, 105-235.
- Franks, F. (1985). In *Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures*. Cambridge University Press.

- French, S. & Wilson, K. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Cryst.* **A34(4)**(July), 517-525.

G

- Garavito, R. M., Berger, D. & Rossmann, M. G. (1977a). Molecular asymmetry in an abortive ternary complex of lobster glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **16(20)**(Oct. 4), 4393-4398.
- Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **30**, 211-237.
- Gonzalez, A. & Nave, C. (1994). Radiation damage in protein crystals at low temperature. *Acta Cryst.* **D50**, 874-877.
- Gonzalez, A., Tompson, A. W. & Nave, C. (1992). No title. *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 1177-1180.
- Griffith, J. P., Lee, B., Murdock, A. L. & Amelunxen, R. E. (1983). Molecular symmetry of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus coagulans*. *J. Mol. Biol.* **169**, 963-974.
- Gutfreund, H. & Knowles, J. R. (1967). The foundations of enzyme action. *Essays Biochem.* **3**, 25-72.

H

- Haas, D. J. & Rossmann, M. G. (1970). Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at 75 degrees C. *Acta Crystallogr [B]* **26(7)**(Jul 15), 998-1004.
- Habenicht, A., Hellman, U. & Cerff, R. (1994). Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J. Mol. Biol.* **237**, 165-171.
- Hadfield, A., Kryger, G., Ouyang, J., Petsko, G. A., Ringe, D. & Viola, R. (1999). Structure of aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*, a key enzyme in the aspartate family of amino acid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **289**(Jun 18), 991-1002.
- Hajdu, J. (1993). Fast crystallography and time-resolved structures. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 467-498.
- Harrigan, P. J. & Trentham, D. R. (1973). Kinetic studies of the acylation of pig muscle D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by 1,3-diphosphoglycerate and of proton uptake and release in the overall enzyme mechanism. *Biochem. J.* **135(4)**(Dec.), 695-703.

- Harrigan, P. J. & Trentham, D. R. (1974). Kinetic studies of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide facilitated reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemical J.* **143**, 353-363.
- Harris, J. I. & Perham, R. N. (1965). Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases - I The Protein Chains in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Pig Muscle. *Journal of Molecular Biology* **13**, 876-884.
- Harris, J. I. & Waters, M. (1976). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.), Vol. 13, pp. 1-49. Academic Press, New York.
- Hartmann, H., Zinser, S., Komninos, P., Schneider, R. T., Nienhaus, G. U. & Parak, F. (1996). X-ray structure determination of a metastable state of carbonmonoxy myoglobin after photodissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93(14)**(Jul. 9), 7013-7016.
- He, J. J. & Quioco, F. A. (1993). Dominant role of local dipoles in stabilizing uncompensated charges on a sulfate sequestered in a periplasmic active transport protein. *Protein Sci.* **2(10)**(Oct.), 1643-1647.
- Helliwell, J. R. (1998). Synchrotron radiation facilities. *Nat. Struct. Biol.* **5 Suppl.**(Aug.), 614-617.
- Henderson, R. (1990). No title. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* **241**, 6-8.
- Hendrickson, W. A. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254(5028)**(Oct. 4), 51-58.
- Hobough, M. R., Song, L., Cheley, S., Shustak, C., Bayley, H. & Gouaux, J. E. (1995). *Annu. Meet. Am. Crystallogr. Assoc.*, Abstract WO48.
- Hol, W. G. H. (1985). The role of the α -helix dipole in protein function and structure. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **45**, 149-195.
- Hol, W. G. J., Van Duijnen, P. T. & Berendsen, H. J. C. (1978). The α -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* **273**, 443-446.
- Holmes, M. A., Remington, S. J., Schwendimann, B., Christie, G. E. & Matthews, B. W. (1977). Crystallographic Data for Sturgeon Holo-D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase : A Holo-D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase with Crystallographic 2-fold Symmetry. *J. Mol. Biol.* **112**, 651-652.

I

- Iglesias, A. & Losada, M. (1988). Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 830-840.

- Iglesias, A. A., Serrano, A., Guerrero, M. G. & Losada, M. (1987). Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **925**, 1-10.
- Isupov, M. N., Fleming, T. M., Dalby, A. R., Crowhurst, G. S., Bourne, P. C. & Littlechild, J. A. (1999). Crystal structure of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **291(3)**(Aug. 20), 651-660.

J

- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of protein. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. & Eklund, H. (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **7(10)**(Oct.), 2106-2117.
- Johnson, L. N. (1992). Time-resolved protein crystallography. *Protein Sci.* **1(10)**(Oct.), 1237-1243.
- Jones, G. D., Lea, J. S., Symons, M. C. & Taiwo, F. A. (1987). Structure and mobility of electron gain and loss centres in proteins. *Nature* **330(6150)**(Dec 24-31), 772-773.

K

- Kanno, H., Speedy, R. J. & Angel, C. A. (1975). No title. *Science* **189**, 880-881.
- Kim, H., Feil, I. K., Verlinde, C. L., Petra, P. H. & Hol, W. G. (1995). Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana* : implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site. *Biochemistry* **34(46)**(Nov. 21), 14975-14986.
- Kirschner, K., Gallego, E., Schuster, I. & Goodall, D. (1971). Cooperative Binding of Nicotinamide-adenine Dinucleotide to Yeast Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **58**, 29-50.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1997). Model-building and refinement practice. In *Methods in Enzymology*, Vol. 277, pp. 208-230.

- Korndörfer, I., Steipe, B., Huber, R., Tomschy, A. & Jaenicke, R. (1995). The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**(4)(Mar. 3), 511-521.
- Kraut, J. (1977). Serine proteases : structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 331-358.
- Kunkel, T. A., Bebenek, K. & McClary, J. (1991). Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. In *Methods Enzymol.*, Vol. 204, pp. 125-139.

L

- Lamb, A. L. & Newcomer, M. E. (1999). The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution : implications for retinal specificity. *Biochemistry* **38**(19)(May 11), 6003-6011.
- La Reau, R. D. & Anderson, V. E. (1989). Lactate dehydrogenase displays absolute stereospecificity in the transfer of the prochiral hydrogen of NADH. *J. Biol. Chem.* **264**, 15338-15343.
- Larsen, F. K. (1995). *Acta Cryst.* **B51**, 468-582.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK : a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Applied Crystallography* **26**, 283-291.
- Ledvina, P. S., Yao, N., Choudhary, A. & Quioco, F. A. (1996). Negative electrostatic surface potential of protein sites specific for anionic ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**(13)(Jun. 25), 6786-6791.
- Lee, B., P., G. J., C.H., P., I., S. R., J., M., L., M. A. & E., A. R. (1982). Preliminary crystallographic data for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophile *Bacillus coagulans*. *J. Mol. Biol.* **158**, 153-156.
- Lee, J. W., Chan, M., Law, T. V., Kwon, H. J. & Jap, B. K. (1995). Preliminary cryocrystallographic study of the mitochondrial cytochrome bcl complex: improved crystallization and flash-cooling of a large membrane protein. *J. Mol. Biol.* **252**(1)(Sep. 8), 15-19.
- Levy, L. M. & Betts, G. F. (1989). Stereospecificity of C4 nicotinamide hydrogen transfer of the NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **997**, 331- 333.

- Lima, C. D., Wang, J. C. & Mondragon, A. (1994). Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of E. coli DNA topoisomerase I. *Nature* **367(6459)**(Jan. 13), 138-146.
- Lin, Z.-J., Li, J., Zhang, F.-M., Song, S.-Y., Yang, J., Liang, S.-J. & Tsou, C.-L. (1993). Structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor* carrying the fluorescent NAD derivatives at 2.7 Å resolution. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 161-166.
- Lis, T. & Jerzykiewicz, L. B. (1996). Disodium D-3-Phosphoglycerate (a Reinvestigation at 80 K) and Bis(cyclohexylammonium) D-3-Phosphoglycerate Dihydrate at 85 K. *Acta Crystallographica Section C* **52(1)**(January), 129-134.
- Litt, A., Arnez, J. G., Klaholz, B. P., Mitschler, A. & Moras, D. (1998). A eucentric goniometer head sliding on an extended removable arc modified for use in cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **31(4)**(August), 638-640.
- Liu, L. & Huskey, W. P. (1992). Progress in establishing the rate-limiting features and kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. *Biochemistry* **31(30)**(Aug. 4), 6898-6903.
- Lui, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. & et al. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the rossmann fold. *Nature Structural Biology* **4**, 317-326.

M

- Makinen, M. W. & Fink, A. L. (1977). Reactivity and cryoenzymology of enzymes in the crystalline state. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 301-43.
- Martin, W., Brinkmann, H., Savonna, C. & Cerff, R. (1993). Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: Eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8692-8696.
- Martinez-Liarte, J. H., Iriarte, A. & Martinez-Carrion, M. (1992). Inorganic phosphate binding and electrostatic effects in the active center of aspartate aminotransferase apoenzyme. *Biochemistry* **31(10)**(Mar. 17), 2712-2719.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33(2)**(Apr. 28), 491-497.
- McCaul, S. & Byers, L. D. (1976). The reaction of epoxides with yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72(3)**(Oct. 4), 1028-1034.

- Meiering, E. M., Bycroft, M. & Fersht, A. R. (1991). Characterization of phosphate binding in the active site of barnase by site-directed mutagenesis and NMR. *Biochemistry* **30(47)**(Nov. 26), 11348-11356.
- Mercer, W. D., Winn, S. I. & Watson, H. C. (1976). Twinning in crystals of human skeletal muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **104**, 277-283.
- Michels, S., Scagliarini, S., Della Seta, F., Carles, C., Riva, M., Trost, P. & Branlant, G. (1994). Arguments against a close relationship between non-phosphorylating and phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **339**, 97-100.
- Michels, S., Rogalska, E. & Branlant, G. (1996). Phosphate-binding sites in phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* **235(3)**(Feb. 1), 641-647.
- Moffat, K., Bilderback, D., Schildkamp, W., Szebenyi, D. & Teng, T. Y. (1989). Laue photography from protein crystals. (Woodhead, R. M. S. A. D., ed.), pp. 325-330. Plenum Press, New York.
- Moffat, K., Chen, Y., McRee, K. N. D. & Getzoff, E. (1992). Time-resolved crystallography : principles, problems and practice. In *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* (Society, R., ed.), Vol. 340, pp. 175-190, London.
- Moffat, K. & Ren, Z. (1997). Synchrotron radiation applications to macromolecular crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7(5)**(Oct.), 689-696.
- Moody, P. C. E. (1984). Structural Studies of the Active Site and Catalytic Function of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. Ph. D., University of London.
- Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M. & Baker, E. N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase : the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6(12)**(Dec. 15), 1541-1551.
- Moras, D., Olsen, K. W., Sabesan, M. N., Buehner, M., Ford, G. C. & Rossmann, M. G. (1975). Studies of asymmetry in the three-dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **250**, 9137-9162.
- Muller-Boschi, S. (1997). Remodelage du site actif des Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénases au cours de l'évolution et par ingénierie protéique. Biochimie, Biologie Moléculaire et Enzymologie, Henri Poincaré, Nancy I.
- Murthy, M. R. N., Garavito, R. M., Johnson, J. E. & Rossmann, M. G. (1980). The Structure of Lobster Apo-D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase at 3.0 Angstroms Resolution. *J. Mol. Biol.* **138(4)**(Apr. 25), 859-872.

- Navaza, J. (1994). AMoRe : an Automated Package for Molecular Replacement. *Acta Crystallographica, Serie A* **50**, 157-163.
- Nave, C. (1995). No title. *Radiat. Phys. Chem.* **45**, 483-490.
- Ni, L., Zhou, J., Hurley, T. D. & Weiner, H. (1999). Human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase : three-dimensional structure and the restoration of solubility and activity of chimeric forms. *Protein Sci.* **8(12)**(Dec.), 2784-2790.
- Nicholls, A., Sharp, K. A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11(4)**, 281-296.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. F. & Nyborg, J. (1995). Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* **270(5241)**(Dec. 1), 1464-1672.

O

- Otwinowski, K. & Minor, W. (1996). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In *Methods in Enzymology* Academic Press edit. (Carter, C. W. & Sweet, R. M., eds.), Vol. 276.

P

- Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1992). Transcription factors : structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Petsko, G. A. (1975). Protein crystallography at sub-zero temperatures: cryo-protective mother liquors for protein crystals. *J. Mol. Biol.* **96(3)**(Aug. 15), 381-392.
- Pohl, E., Heine, A., Sheldrick, G. M., Dauter, Z., Schneider, T., Wilson, K. S. & Kallen, J. (1995). Comparison of different X-ray data-collection systems using the crystal structure of octreotide. *Acta Cryst.* **D51**(January), 60-68.
- Prüb, B., Meyer, H. E. & Holldorf, A. W. (1993). Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula vallismortis*. *Arch. Microbiol.* **160**, 5-11.

R

- Ramakrishnan, C., Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys. J.* **5(6)**(Nov.), 909-933.
- Rao, S. T. & Rossmann, M. G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* **76(4)**(Jun 5.), 533-537.
- Rasmussen, B. F., Stock, A. M., Ringe, D. & Petsko, G. A. (1992). Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K. *Nature* **357(6377)**(Jun. 4), 423-424.
- Ray, W. J. J., Bolin, J. T., Puvathingal, J. M., Minor, W., Liu, Y. W. & Muchmore, S. W. (1991). Removal of salt from a salt-induced protein crystal without cross-linking. Preliminary examination of "desalted" crystals of phosphoglucomutase by X-ray crystallography at low temperature. *Biochemistry* **30(28)**(Jul. 16), 6866-6875.
- Rodgers, D. W. (1994). Cryocrystallography. *Structure* **2**, 1135-1140.
- Rodgers, D. W. (1996). In *Methods Enzymol.*, Vol. 276, pp. 183-203.
- Rose, I. A. & O'Connell, E. L. (1969). Inactivation and labeling of triose phosphate isomerase and enolase by glycidol phosphate. *J. Biol. Chem.* **244(23)**(Dec. 10), 6548-6550.
- Rossmann, M. G., Adams, M. J., Buehner, M., Ford, G. C., Hackert, M. L., Liljas, A., Rao, S. T., Banaszak, L. J., Hill, E., Tsernoglou, D. & Webb, L. (1973). Molecular symmetry axes and subunit interface in certain dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **76**, 533-537.
- Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-199.
- Roussel, A. & Cambillau, C. (1989). TURBO-FRODO. In *Silicon Graphics Geometry Partner Directory* (SiliconGraphics, ed.), pp. 77-78. Silicon Graphics, Mountain View.
- Rudman, R. (1976). *Low-Temperature X-ray Diffraction*, Plenum Press, New York.

S

- Schlichting, I., Berendzen, J., Phillips, G. N. J. & Sweet, R. M. (1994). Crystal structure of photolysed carbonmonoxy-myoglobin. *Nature* **371(6500)**(Oct. 27), 808-812.
- Schmidt, J., Benecky, M., Kafina, M., Watters, K. L. & McFarland, J. T. (1978). Resonance Raman investigation of beta-(2-furyl)-acryloyl-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **96(2)**(Dec. 15), 263-268.
- Schneider, T. (1996a). Technical University.

- Schneider, T. R. (1996b). In *Proc. CCP4 Study Weekend* (Dodson, E. J., Moore, M., Ralf, A. & Bailey, S., eds.), pp. 133-134, Daresbury Laboratory, Warrington, England.
- Skarzynski, T., Moody, P. C. E. & Wonacott, A. J. (1987). Structure of hologlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 resolution. *J. Mol. Biol.* **193**, 171-187.
- Skarzynski, T. & Wonacott, A. J. (1988). Coenzyme-induced conformational changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* **203**, 1097-1118.
- Smith, S. O., Farr-Jones, S., Griffin, R. G. & Bachovchin, W. W. (1989). Crystal versus solution structures of enzymes: NMR spectroscopy of a crystalline serine protease. *Science* **244**(4907)(May 26), 961-964.
- Song, S., Li, J. & Lin, Z. (1998). Structure of Holo-glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Palinurus versicolor* Refined at 2 Å Resolution. *Acta Cryst.* **D54**(4)(July 1), 558 - 569.
- Song, S. Y., Gao, Y. G., Zhou, J. M. & Tsou, C. L. (1983). Preliminary Cristallographic Studies of Lobster D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and the Modified Enzyme Carrying the Fluorescent Derivative. *J. Mol. Biol.* **171**, 225-228.
- Song, S. Y., Xu, Y. B., Lin, Z. J. & Tsou, C. L. (1999). Structure of active site carboxymethylated D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor*. *J. Mol. Biol.* **287**(4)(Apr. 9), 719-725.
- Souza, D. H., Garratt, R. C., Araujo, A. P., Guimaraes, B. G., Jesus, W. D., Michels, P. A., Hannaert, V. & Oliva, G. (1998). Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *FEBS Lett.* **424**(3)(Mar. 13), 131-135.
- Stec, B., Troxler, R. F. & Teeter, M. M. (1995). Crystal structure of C-phycoyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. *Biophys. J.* **76**(6)(Jun.), 2912-2921.
- Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. & Hurley, T. D. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase : the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**(5)(May 15), 701-711.
- Symons, M. C. R. (1995). No title. *Radiat. Phys. Chem.* **45**, 837-845.

- Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J. & Branlant, G. (1998). Comparative study of the catalytic domain of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from bacteria and archaea via essential cysteine probes and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **252**(3)(Mar. 15), 447-457.
- Tanner, J. J., Hecht, R. M. & K.L., F. (1996). Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 2597-2609.
- Teng, T.-Y. (1990). Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a free-standing thin film. *J. Appl. Cryst.* **23**, 387-391.
- Teng, T. Y., Srajer, V. & Moffat, K. (1994). Photolysis-induced structural changes in single crystals of carbonmonoxy myoglobin at 40 K. *Nat. Struct. Biol.* **1**(10)(Oct.), 701-705.
- Thomanek, U. F., Parak, F. & Wintergerst, B. (1977). *Z. Naturforsch* **32c**, 11-19.
- Trentham, D. R. (1968). Aspects of the chemistry of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* **109**(4)(Oct.), 603-612.
- Trentham, D. R. (1971a). Reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochemical J.* **122**, 59-69.
- Trentham, D. R. (1971b). Rate-determining processes and the number of simultaneously active sites of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemical J.* **122**, 71-77.
- Tulinsky, A. & Wright, L. H. (1973). An X-ray crystallographic investigation of exchange of localized sulfate ions in crystals of alpha-chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* **81**(Nov. 25), 47-56.

V

- Vas, M., Berni, R., Mozzarelli, A., Tegoni, M. & Rossi, G. L. (1979). Kinetic studies of crystalline enzymes by single crystal microspectrophotometry. Analysis of a single catalytic turnover in a D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase crystal. *J. Biol. Chem.* **254**(17)(Sep. 10), 8480-8486.
- Vellieux, F. M., Hajdu, J., Verlinde, C. L., Groendijk, H., Read, R. J., Greenhough, T. J., Campbell, J. W., Kalk, K. H., Littlechild, J. A., Watson, H. C. & al., e. (1993). Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**(6)(Mar. 15), 2355-2359.

- Vellieux, F. M. D., Hajdu, J. & Hol, W. G. J. (1995). Refined 3.2 Å structure of glycosomal holo glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Cryst.* **D51**, 575-589.
- Volkmann, N., Hottenträger, S., Hansen, H. A., Zayzsev-Bashan, A., Sharon, R., Berkovitch-Yellin, Z., Yonath, A. & Wittmann, H. G. (1990). Characterization and preliminary crystallographic studies on large ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **216(2)**(Nov. 20), 239-240.

W

- Waley, S. G., Miller, J. C., Rose, I. A. & O'Connell, E. L. (1970). Identification of site in triose phosphate isomerase labelled by glycidol phosphate. *Nature* **227(254)**(Jul. 11), 181.
- Watenpugh, K. D. (1991). *Curr. Op. Struct. Biol.* **1**, 1012-1015.
- Watowich, S. J., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1995). Cryocrystallography of influenza virus hemagglutinin crystals. *Acta Cryst.* **D51**, 7-12.
- Watson, H. C. & Banaszak, L. J. (1964). Structure of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. Structural Symmetry within the Molecule. *Nature* **204**, 918-920.
- Watson, H. C., Duée, E. & Mercer, W. D. (1972). Low Resolution Structure of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *Nature New Biol.* **240**, 130-139.
- Watt, W., Tulinsky, A., Swenson, R. P. & Watenpugh, K. D. (1991). Comparison of the crystal structures of a flavodoxin in its three oxidation states at cryogenic temperatures. *J. Mol. Biol.* **218(1)**(Mar. 5), 195-208.
- Weinhold, E. G., Glasfeld, A., Ellington, A. D. & S., B. (1991). Structural determinants of stereospecificity in yeast alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8420-8424.
- Wierenga, R. K., De Maeyer, M. C. H. & Hol, G. J. (1985). Interaction of pyrophosphate moieties with α -helixes in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* **24**, 1346-1357.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P. & Hol, W. G. J. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101-107.
- Wlodawer, A., Hodgson, K. O. & Bensch, K. (1975). Studies of two crystal forms of L-glutaminase-asparaginase from *Acinetobacter glutaminasificans*. *J. Mol. Biol.* **99(2)**(Dec. 5), 295-299.

- Wood, R. D., Burki, H. J., Hughes, M. & Poley, A. (1983). Radiation-induced lethality and mutation in a repair-deficient CHO cell line. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **43(2)**(Feb.), 207-213.

Y

- Yang, Z. N., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (1997). Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase : a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **265(3)**(Jan. 24), 330-343.
- You, K.-S. (1982). Stereospecificities of the pyridine nucleotide-linked enzymes. *Methods Enzymol.* **87**, 101-126.
- Young, A. C. M., Dewan, J. C., Nave, C. & Tilton, R. F. (1993). Comparison of radiation-induced decay and structure refinement from X-ray data collected from lysozyme crystals at low and ambient temperatures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 319-319.
- Young, A. C. M., Dewan, J. C., Thompson, A. W. & Nave, C. (1990). Enhancement in resolution and lack of radiation damage in a rapidly frozen lysozyme crystal subjected to high-intensity synchrotron radiation. *J. Appl. Cryst.* **23**, 215-218.

Z

- Zhang, L., Ahvazi, B., Szittner, R., Vrieling, A. & Meighen, E. (1999). Change of nucleotide specificity and enhancement of catalytic efficiency in single point mutants of *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **38(35)**(Aug. 31), 11440-11447.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Résumé

Les travaux présentés dans ce manuscrit concernent l'étude cristallographique de complexes ternaires enzyme/cofacteur/substrat de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de *B. stearothermophilus*. Cette enzyme catalyse la phosphorylation oxydative du Glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en présence d'un cofacteur, le NAD, et de phosphate inorganique (Pi). Pour fixer les groupements phosphates de ces deux substrats (G3P et Pi), l'enzyme possède deux sites de reconnaissance anionique, dénommés respectivement *Pi* et *Ps*. Cependant, la façon dont ces deux sites contribuent à la fixation des deux groupements phosphate reste encore soumise à controverse et différents modèles ont été proposés dans la littérature. Afin de tester la validité de ces modèles, il semblait essentiel de pouvoir disposer d'évidences structurales directes, en étudiant le site actif en présence de son substrat physiologique. Le complexe ternaire de type *GAPDH/NAD/G3P* étant actif, la détermination de sa structure était difficilement envisageable. Ce problème a été contourné en modifiant la nature du nucléophile essentiel (Cys149) par ingénierie protéique. Le mutant (C149A) ainsi obtenu est inactif et le mutant (C149S) n'est que très faiblement actif.

Des cristaux de ces deux mutants ont été obtenus dans des conditions originales, exemptes de tout anion. Ces nouvelles conditions de cristallisation ont conduit à de nouveaux empilements cristallins. Les collectes par la méthode de cryocristallographie a permis de contourner les problèmes de dégradations des cristaux sous les rayons X et de maximiser la durée de vie des complexes. L'analyse des structures des complexes binaires met en évidence des sites *Pi* libres de tout anion. Par contre, les sites *Ps* sont occupés par un anion sulfate issu probablement de la purification. Ceci montre que le site *Ps* a une meilleure affinité que le site *Pi* vis-à-vis des anions. Ce résultat a été confirmé par l'analyse des acides aminés impliqués dans la formation des sites *Pi* et *Ps* et par le fait que le potentiel électrostatique local est plus important au niveau du site *Ps* qu'au niveau site *Pi*. Les complexes ternaires que nous avons obtenus constituent la première structure tridimensionnelle d'une GAPDH en complexe avec son substrat physiologique. L'analyse de ces complexes a permis d'apporter des informations quant aux interactions enzyme-substrat dans un stade mimant vraisemblablement le complexe de reconnaissance michaelien (complexe non covalent). Nous montrons sans ambiguïté que dans les deux complexes obtenus, le groupement phosphate du G3P est localisé dans le site *Ps*. De même, les facteurs moléculaires responsables de la stéréosélectivité que l'enzyme présente vis-à-vis du D-G3P ont pu être clairement élucidés. Cependant, le débat reste ouvert concernant, d'une part, la contribution de la boucle 205-210 à la catalyse et d'autre part, la conséquence de la formation de la liaison covalente entre l'enzyme et le substrat sur le positionnement des intermédiaires réactionnels dans le site actif.

Mots clés : *GAPDH Phosphorylante ; Glycéraldéhyde-3-phosphate ; mécanisme réactionnel ; mutant C149A ; mutant C149S ; Cryocristallographie ; stéréosélectivité ; complexe ternaire.*