HAL
open science

Rôle de la structure quaternaire de la Glycéraldéhyde 3-phosphate Déshydrogénase (GAPDH) phosphorylante de Bacillus stearothermophilus dans la révélation de l'activité enzymatique et les propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur

Olivier Roitel

To cite this version:

Olivier Roitel. Rôle de la structure quaternaire de la Glycéraldéhyde 3-phosphate Déshydrogénase (GAPDH) phosphorylante de Bacillus stearothermophilus dans la révélation de l'activité enzymatique et les propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1999. Français. NNT : 1999NAN10291 . tel-01748643

HAL Id: tel-01748643

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748643

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy I

U.F.R Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie et Santé

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Enzymologie Moléculaire

par **Olivier ROITEL**

Rôle de la structure quaternaire de la Glycéraldéhyde 3-phosphate Déshydrogénase (GAPDH) phosphorylante de *Bacillus stearothermophilus* dans la révélation de l'activité enzymatique et les propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur.

Soutenance publique prévue le 16 décembre 1999 devant la commission d'examen :

Mr O. DIDEBERG	Directeur de Recherche CNRS, Grenoble	*Rapporteur*
Mr M. DESMADRIL	Directeur de Recherche CNRS, Orsay	*Rapporteur*
Mr A. AUBRY	Directeur de Recherche CNRS, Nancy I	*Examinateur*
Mr H. PETITDEMANGE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I	*Examinateur*
Mr G. BRANLANT	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I	*Directeur de Thèse*

Travail réalisé dans l'UMR CNRS-UHP 7567, Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire
Faculté des Sciences - BP 236 – 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

Je remercie tout d'abord Monsieur le Professeur Guy Branlant, Responsable de l'équipe Enzymologie Moléculaire au sein de l'UMR 7567 CNRS-UHP, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir accepté de diriger cette thèse. Je le remercie également pour la formation qu'il m'a transmise, les discussions scientifiques que nous avons eues et pour ses conseils jusque dans la rédaction de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Otto Dideberg et au Docteur Michel Desmadril, Directeurs de Recherche au CNRS qui ont bien voulu me faire l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je tiens également à remercier le Docteur André Aubry et le Professeur Henri Petitdemange pour avoir accepté de participer aux travaux de ce jury.

J'associe à ces remerciements les Docteurs Emile Duée et Guillermo Mulliert-Carlin pour l'ensemble des études de modélisation moléculaire et leur grande disponibilité.

Mes remerciements s'adressent également à Héléne Rogniaux et aux Docteurs Noëlle Potier et Alain Van Dorsselaer, Directeur du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique UMR 7509 CNRS-ULP pour les analyses par spectrométrie de masse et l'intérêt manifesté pour ce travail.

Un grand merci au Professeur Muronetz et à ses collaborateurs de l'Institut A.N Belosersky de Biologie Physico-Chimique de l'Université d'Etat de Moscou pour les analyses par calorimétrie différentielle ; au Docteur Moncef Ladjimi du Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurale UPR CNRS 9063 pour les analyses par ultracentrifugation analytique; au Docteur Jean-Franck Bussoti, Directeur de la société SAFAS pour le partenariat établi depuis l'acquisition du spectrofluorimètre et à mon ancien compère Eduard Sergienko et à sa femme Pepipa pour leur aide précieuse lors de la rédaction de la publication.

Je voudrais enfin remercier l'ensemble de mes collègues anciens et actuels pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur. Un grand merci à Jackie, Séverine, Evelyne et Saïd pour leur précieuse assistance technique. J'adresse un remerciement particulier à Sandrine, Stéphane et François pour leur soutien, leur amitié, les nombreuses discussions et les bons moments passés au et en dehors du laboratoire. Un grand merci également à Sophie. Je remercie sincèrement Delphine et Benoit pour leur aide précieuse dans la mise en forme de ce mémoire.

Enfin, je terminerai par les personnes qui me sont les plus chères, mes parents, mes sœurs ainsi que l'ensemble de ma famille, sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

INTRODUCTION

S.C.D. U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

I) INTRODUCTION DE LA PROBLEMATIQUE. 1

II) ROLE DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DES PROTEINES OLIGOMERIQUES. 2

II.1) STABILITE. 2
II.2) ACTIVITE. 3
II.3) REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE. 4
II.3.1) REGULATION DE L'ACTIVITE PAR ASSOCIATION-DISSOCIATION DE L'ENZYME. 4
II.3.2) PHENOMENES DE COOPERATIVITE DE FIXATION. 6
II.4) APPROCHES UTILISEES POUR ETUDIER LE ROLE DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE. 6
II.4.1) ETUDE DE LA DISSOCIATION. 6
II.4.1.1) Etude de la dissociation des protéines oligomériques par une variation de différents effecteurs physico-chimiques. 6
II.4.1.1.1) Dissociation de protéines oligomériques par la pression. 6
II.4.1.1.2) Dissociation de protéines oligomériques par la température. 7
II.4.1.1.3) Dissociation par le pH, les sels et les différents ligands. 8
II.4.1.2) Modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée. 9
II.4.1.2.1) Suppression d'interactions stabilisatrices. 10
II.4.1.2.2) Modification d'éléments de structure secondaire stabilisateurs. 10
II.4.1.2.3) Introduction de mutations déstabilisatrices. 10
II.4.1.2.4) Effets à longue distance. 11
II.4.2) FORMATION D'HETERO-OLIGOMERES. 12

III) STRUCTURE DES INTERFACES ENTRE SOUS-UNITES. 12

III.1) ETUDE STATISTIQUE DE LA STRUCTURE DES INTERFACES. 13
III.1.1) FORME DE L'INTERFACE. 13
III.1.2) COMPLEMENTARITE GEOMETRIQUE DE L'INTERFACE. 14
III.1.3) MOTIFS STRUCTURAUX RETROUVES A L'INTERFACE. 14
III.1.4) SYMETRIE. 15
III.1.5) PRESENCE D'UN TUNNEL A L'INTERFACE (UNIQUEMENT DANS LE CAS DES TETRAMERES). 15
III.1.6) CARACTERE HYDROPHOBE DE L'INTERFACE. 15
III.1.7) LIAISONS S'ETABLISSANT A L'INTERFACE. 16
III.1.8) INTERACTIONS POLAIRES ET HYDROPHOBES PREFERENTIELLEMENT RETROUVEES A L'INTERFACE. 17
III.1.9) FRACTION DE LA SURFACE DU MONOMERE UTILISEE POUR L'ASSOCIATION AVEC LES AUTRES SOUS-UNITES. 17
III.1.10) AUTRES FACTEURS STABILISANT L'INTERFACE. 18
III.1.10.1) Molécules d'eau. 18
III.1.10.2) Les ponts disulfure. 18
III.1.11) RECAPITULATIF DES CONDITIONS A REMPLIR POUR QUE LA SURFACE D'UN MONOMERE FORME UNE INTERFACE. 19

III.2) ETUDE VISUELLE DE LA STRUCTURE DE CHAQUE INTERFACE. 19
III.2.1) LES DIFFERENTS TYPES D'INTERFACE RENCONTRES. 20
III.2.1.1) Interfaces classiques. 20
III.2.1.2) Interfaces sans cœur hydrophobe. 20
III.2.1.3) Interfaces entrelacées. 20
III.2.2) MOLECULES D'EAU A L'INTERFACE 21
III.2.3) CONSEQUENCES AU NIVEAU DU REPLIEMENT ET DE L'ASSOCIATION DES SOUS-UNITES. 21

IV) REPLIEMENT ET ASSOCIATION DES SOUS-UNITES. 22

IV.1) MECANISMES D'ASSOCIATION DES SOUS-UNITES. 23
IV.1.1) ASSOCIATION DES SOUS-UNITES SANS PASSER PAR UN INTERMEDIAIRE MULTIMERIQUE. 23
IV.1.2) ASSOCIATION DES SOUS-UNITES VIA UN OU PLUSIEURS INTERMEDIAIRES MULTIMERIQUES. 23
IV.1.3) ASSOCIATION DES SOUS-UNITES VIA DES ESPECES METASTABLES. 24
IV.2) SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE DES SOUS-UNITES. 25

V) LA GAPDH DE *B. stearothermophilus* : UN BON MODELE D'ETUDE. 26

V.1) STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE. 26
V.1.1) STRUCTURE DU MONOMERE. 26
V.1.1.1) Topologie des deux domaines structuraux. 27
V.1.1.2) Mode de liaison du cofacteur. Conséquences de la transition apo-holo 27
V.1.1.3) Les sites de fixation des substrats. 30
V.1.2) ORGANISATION QUATERNAIRE. 31
V.1.2.1) Symétries. 31
V.1.2.2) Interfaces entre sous-unités. 31
V.1.2.3) Coopérativité de fixation du NAD. 32
V.1.2.3.1) Généralités. 32
V.1.2.3.2) Cas de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. 34
V.2) MECANISME ENZYMATIQUE. 35
V.2.1) RESIDUS CATALYTIQUES. 35
V.2.2) MECANISME ENZYMATIQUE. 36

VI) OBJECTIFS. 38

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

MATERIEL ET METHODES

S.C.D. - U.H.P. NANCY I SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

I) MATERIEL BIOLOGIQUE. 39

I.1) PLASMIDES ET PHAGES. 39
I.2) SOUCHES BACTERIENNES. 39
I.2.1) SOUCHES UTILISEES POUR LES PREPARATIONS PLASMIDIQUES ET LA MUTAGENESE DIRIGEE. 39
I.2.2) SOUCHES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DE LA GAPDH. 40
I.3) MILIEUX DE CULTURE. 40

II) TECHNIQUES DE GENIE GENETIQUE. 41

II.1) TRANSFORMATION DES BACTERIES COMPETENTES. 41
II.1.1) TECHNIQUE CLASSIQUE (Maniatis *et al*, 1989). 41
II.1.2) BACTERIES SUPERCOMPETENTES (Inoue *et al*, 1990). 42
II.2) PREPARATION DE L'ADN. 42
II.2.1) ADN DOUBLE BRIN (db). 42
II.2.1.1) La technique du lysat clair. 42
II.2.1.2) La minipréparation. 43
II.2.2) ADN SIMPLE BRIN (sb). 43
II.3) ANALYSE DE L'ADN. 43
II.3.1) AMPLIFICATION DE L'ADN PAR LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR, POUR POLYMERASE CHAIN REACTION). 43
II.3.2) DIGESTION PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION. 44
II.3.3) SEQUENCAGE DE L'ADN db. 44
II.4) MUTAGENESE DIRIGEE. 46
II.4.1) MUTAGENESE SELON DENG ET NICKOLOFF. 46
II.4.1.1) Principe de la méthode (Deng et Nickoloff, 1992). 46
II.4.1.2) Phosphorylation des oligonucléotides. 46
II.4.1.3) Hybridation des amorces et synthèse du brin muté complémentaire. 46
II.4.1.4) Première selection des plasmides mutés. 47
II.4.1.5) Seconde selection des plasmides mutés. 47
II.4.2) MUTAGENESE SELON KUNKEL. 48
II.4.2.1) Principe de la méthode (Kunkel, 1985 ; Kunkel *et al*, 1991). 48
II.4.2.2) Phosphorylation de l'oligonucléotide. 48
II.4.2.3) Préparation du simple brin riche en dUTP. 48
II.4.2.4) Mutagenèse. 48
II.4.3) MUTAGENESE SELON LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR, POUR POLYMERASE CHAIN REACTION). 49
II.4.3.1) Principe de la méthode. 49
II.4.3.2) Phosphorylation des oligonucléotides. 50
II.4.3.3) Mutagenèse. 50

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHEQUE

III) PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA GAPDH DE *B. stearothermophilus*. 51

III.1) PRODUCTION DES GAPDH SAUVAGE ET MUTEES DE *B. stearothermophilus*. 51
III.2) PURIFICATION DES GAPDH SAUVAGE ET MUTEES DE *B stearothermophilus* 51
III.2.1) SONICATION ET PRECIPITATIONS FRACTIONNEES AU SULFATE D'AMMONIUM. 51
III.2.2) FILTRATION SUR GEL. 52
III.2.3) CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS. 52
III.2.4) CHROMATOGRAPHIE HYDROPHOBE. 52
III.3) PREPARATION DE LA FORME APO-ENZYME DES DIFFERENTES GAPDH DE *B. stearothermophilus*. 53
III.4) DETERMINATION DE L'ETAT OLIGOMERIQUE DES GAPDH MUTEES. 53
III.4.1) FILTRATION SUR GEL : SUPEROSE 12 COUPLEE AU SYSTEME FPLC. 53
III.4.2) PHENYL SUPEROSE HR5/5 COUPLEE AU SYSTEME FPLC. 53
III.4.3) ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE. 54
III.4.4) ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE. 54
III.4.4.1) Principe. 54
III.4.4.2) Instrumentation. 55
III.4.4.3) Vitesse de sédimentation. 56
III.4.4.4) Détermination des autres paramètres hydrodynamiques. 57
III.4.5) SPECTROMETRIE DE MASSE EN CONDITIONS NATIVES. 58
III.4.6) ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE NON DENATURANT. 58
III.5) CARACTERISATION DE LA GAPDH. 58
III.5.1) ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DENATURANT. 58
III.5.2) DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE. 59
III.5.3) MESURE DE LA CONCENTRATION. 59
III.5.4) TESTS ENZYMATIQUES : CAS DES GAPDH SAUVAGE OU MUTEES DE *B. stearothermophilus*. 59
III.5.4.1) Dans le sens phosphorylation oxydative. 59
III.5.4.2) Dans le sens déphosphorylation réductive. 60

IV) TECHNIQUES D'ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES DES GAPDH MUTEES DE *B. stearothermophilus*. 60

IV.1) DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES A L'ETAT STATIONNAIRE. 60
IV.1.1) G3P, NAD, Pi. 60
IV.1.2) NADH ET 1,3dPG. 61
IV.2) ETUDE DE L'ETAPE D'ACYLATION EN ABSENCE DE PHOSPHATE. 61
IV.3) ETUDE DES ETAPES DE LA REACTION EN CINETIQUE DE MELANGE RAPIDE (STOPPED FLOW). 61

V) TECHNIQUES D'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA GAPDH DE *B. stearothermophilus* et le NAD. 61

V.1) INACTIVATION PAR L'IODOACETAMIDE. 61
V.1.1) PRINCIPE. 61
V.1.2) PROTOCOLE EXPERIMENTAL. 63
V.2) MESURE DE L'AFFINITE DU NAD PAR EXTINCTION DE FLUORESCENCE. 63
V.2.1) MESURES. 63
V.2.2) ANALYSE DES MESURES. 64
V.3) MESURE DE LA BANDE DE RACKER. 65

VI) DICHROISME CIRCULAIRE. 66

VII) TECHNIQUES D'ETUDE DE LA REACTIVITE DE LA CYS149 DANS LA GAPDH DE *B. stearothermophilus*. 67

VIII) SPECTRES DE CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE (DSC POUR DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY). 68

IX) DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'EQUILIBRE DE DISSOCIATION K_{diss} ENTRE LES FORMES TETRAMERIQUE ET DIMERIQUE D'UN MEME MUTANT. 68

IX.1) DETERMINATION DE K_{diss} PAR MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE. 68
IX.1.1) PRINCIPE. 68
IX.1.2) CONDITIONS EXPERIMENTALES. 69
IX.2) DETERMINATION DE K_{diss} A L'AIDE DE LA SUPEROSE 12. 69
IX.2.1) PRINCIPE (Manning *et al*, 1996). 69
IX.2.2) CONDITIONS EXPERIMENTALES. 69

X) MODELISATION MOLECULAIRE. 70

RESULTATS

Partie A

I) MODELISATION MOLECULAIRE – CHOIX DES MUTATIONS. 71

II) PRODUCTION ET PURIFICATION DES MUTANTS. 72

III) CARACTERISATION DE L'ETAT OLIGOMERIQUE. 75

IV) ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES. 76

IV.1) DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES A L'ETAT STATIONNAIRE. 76
IV.2) DETERMINATION DE L'ETAPE LIMITANTE POUR LES FORMES TETRAMERIQUES DES GAPDH MUTEES. 78

V) ETUDE DE LA REACTIVITE DE LA CYSTEINE ESSENTIELLE : CAS DES GAPDH MUTEES (D186G-E276G) ET (N180G-E276G). 78

VI) ETUDE DE LA FIXATION DU COFACTEUR NAD. 79

VI.1) BANDE D'ABSORPTION DU COMPLEXE ENZYME-NAD (BANDE DE RACKER). 79
VI.2) MESURE DE L'AFFINITE DE L'ENZYME POUR LE NAD PAR INACTIVATION A L'IODOACETAMIDE. 80
VI.3) MESURE DE L'AFFINITE DU NAD ET DU NADP PAR SUIVI DE L'EXTINCTION DE FLUORESCENCE DE LA PROTEINE. 80

VII) STABILITE DES MUTANTS VIS A VIS DE LA DENATURATION THERMIQUE, SUIVIE PAR CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE. 83

VIII) ARTICLE. 85

Partie B

Etude de l'équilibre existant entre les deux formes oligomériques, dimère et tétramère, des mutants (N180G-E276G) et Y283V de la GAPDH de B. stearothermophilus.

I) RAPPELS. 93

I.1) PRODUCTION ET PURIFICATION. 93
I.2) PARAMETRES CINETIQUES A L'ETAT STATIONNAIRE. 93

II) ETUDE DES PROPRIETES DE L'EQUILIBRE DIMERE-TETRAMERE. 94

II.1) CINETIQUE DE DISSOCIATION DE LA FORME TETRAMERIQUE. 94
II.2) CINETIQUE D'ASSOCIATION DE LA FORME DIMERIQUE. 94
II.3) DETERMINATION DES CONSTANTES D'EQUILIBRE DE DISSOCIATION (K_{diss}). 95
II.4) ETUDE DE LA REVERSIBILITE DE L'EQUILIBRE DIMERE-TETRAMERE. 96

DISCUSSION

I) LE DIMERE EST DE TYPE O-P 98

II) ROLE DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA GAPDH de *B. stearothermophilus* DANS LA STABILITE DE L'ENZYME. 99

III) ROLE DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA GAPDH DE *B. stearothermophilus* DANS LA REVELATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE. 100

IV) ROLE DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA GAPDH DE *B. stearothermophilus* DANS LA COOPERATIVITE DE FIXATION DU COFACTEUR. 103

V) ETUDE DE L'EQUILIBRE EXISTANT ENTRE DEUX FORMES OLIGOMERIQUES, DIMERE ET TETRAMERE, DU MUTANT (N180G-E276G) DE LA GAPDH DE *B. stearothermophilus* 107

BIBLIOGRAPHIE 111

ABREVIATIONS

B. stearothermophilus	: *Bacillus stearothermophilus*
E. coli	: *Escherichia coli*

1,3 dPG	: 1,3-diphosphoglycérate
2PDS	: 2,2' dithiodipyridine
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADPR	: adénosine diphosphate ribose
ALDH	: aldéhyde déshydrogénase
AMP, ADP, ATP	: adénosine mono-, di-, triphosphate
Amp	: ampicilline
ARNm	: acide ribonucléique messager
ARNr	: acide ribonucléique ribosomique
ARNt	: acide ribonucléique de transfert
bar, kbar	: bar, kilobar
Cm	: chloramphénicol
Da, kDa	: dalton, kilodalton
db	: double brin
dNTP,	: 2'-désoxynucléotide triphospate
ddNTP	: 2',3'-didésoxynucléotide triphosphate
DMSO	: diméthylsulfoxyde
D-G3P	: D-glycéraldéhyde 3-phosphate
DO	: densité optique
DTNB	: dithionitrobenzoate
DTT	: dithiothréitol
dUTP	: 2'-désoxyuracyle triphosphate
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
gap	: gène codant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GAPDH	: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GAPDHase	: activité glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
HIV	: virus de l'immunodéficience acquise humaine
IAM	: iodoacétamide
kb	: kilobase
kcat	: constante catalytique
K_D	: constante de dissociation
K_M	: constante de Michaelis
LB	: Luria Broth
LDH	: lactate déshydrogénase
liaison H	: liaison hydrogène
MDH, MDHc	: malate déshydrogénase, malate déshydrogénase cytosolique
μl, ml, l	: microlitre, millilitre, litre
μM, mM, M	: micromolaire, millimolaire, molaire
NaAc	: acétate de sodium
NAD	: nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NAD(H)	: nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NAD(P)	: nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme oxydée

NAD(P)H	: nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme réduite
nm, μm, mm, cm	: nanomètre, micromètre, millimètre, centimètre
PCR	: polymerase chain reaction
Pa, MPa	: Pascal, mégaPascal
PDI	: protéine disulphure isomérase
PEG	: polyéthylène glycol
Pi	: phosphate inorganique
PMSF	: phenyl méthyl sulfonyl fluorure
PPi	: pyrophosphate
PPI	: peptidyl prolyl cis-trans isomérase
qsp	: quantité suffisante pour
RMN	: résonance magnétique nucléaire
H^1-RMN	: résonance magnétique nucléaire du proton
RX	: rayons X
s, min, h	: seconde, minute, heure
sb	: simple brin
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
TEA	: triéthanolamine
TES	: N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminométhanesulfonate
Tet	: tétracycline
TIM	: triose phosphate isomérase
tmax	: température maximale
Tris	: N-tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	: ultra-violet

Avant-propos.

La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) phosphorylante glycolytique (EC 1.2.1.12) est une enzyme du métabolisme central qui catalyse l'oxydation phosphorylante réversible du D-glycéraldéhyde 3-phosphate (D-G3P) en acide 1,3-diphosphoglycérique (1,3dPG) en présence de NAD(H) comme cofacteur. De nombreuses structures cristallographiques de cette enzyme homotétramérique sont actuellement disponibles à haute résolution. Les propriétés structurales et enzymatiques des GAPDH étant particulièrement bien documentées, ceci en fait un bon modèle pour étudier le rôle de la structure quaternaire dans la révélation de l'activité enzymatique et les propriétés de coopérativité observées lors de la fixation du cofacteur NAD.

Mon projet de recherche avait pour objectifs de déterminer :

1) si l'état tétramérique était indispensable à la révélation de l'activité enzymatique et, si c'est le cas, d'essayer de déterminer les facteurs moléculaires d'interface qui sont impliqués.
2) les facteurs structuraux impliqués dans les propriétés de coopérativité observées lors de la fixation du NAD et notamment d'élucider le rôle de chaque interface.

Pour aborder cette étude j'ai, dans un premier temps, généré des dimères de type O-P (où les sous-unités sont symétriques par rapport à l'axe *P*) à partir de la GAPDH tétramérique sauvage de *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*), par ingénierie protéique. Dans un second temps, j'ai caractérisé les propriétés enzymatiques des GAPDH mutées générées, les ai reliées à leur état oligomérique et les ai comparées à celles de l'enzyme de type sauvage. Dans un troisième temps, j'ai caractérisé les propriétés de coopérativité de fixation du NAD(P) des GAPDH mutées générées et les ai reliées à leur état oligomérique afin de valider le rôle de l'interface P considérée comme potentiellement essentielle. Enfin, j'ai étudié l'équilibre existant entre deux formes oligomériques, dimère et tétramère, d'un même mutant.

Mon mémoire commencera par une revue bibliographique portant sur les avantages potentiels de l'état oligomérique, notamment au niveau de la stabilité, de l'activité et de la régulation de l'activité enzymatique, les différentes approches utilisées pour étudier le rôle de la structure quaternaire, la structure des interfaces, le mécanisme de repliement et d'association des sous-unités, suivie d'une présentation de ce qui est connu sur la structure, le mécanisme enzymatique et la coopérativité de fixation du NAD de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. Après un chapitre « Matériel et Méthodes », les résultats obtenus seront présentés en deux parties :

- la première consacrée à la caractérisation des propriétés enzymatiques et de coopérativité, observée lors de la fixation du NAD(P), des différentes GAPDH mutées générées. Une partie de cette étude sera présentée sous forme d'une publication.

- la seconde consacrée à l'étude de l'équilibre existant entre la forme dimérique et la forme tétramérique d'un même mutant, en l'occurence (N180G-E276G) et Y283V.

Ce chapitre « Résultats » sera suivi d'une partie « Discussion-Conclusion ».

INTRODUCTION

I) Introduction de la problématique.

De nombreuses protéines sont oligomériques dont la majorité des enzymes (de 70 à 80%) (Traut, 1994). Dans la banque de structures cristallographiques Brookhaven Protein Data Bank (Bernstein *et al*, 1977), les formes dimériques et tétramériques sont les plus nombreuses parmi les protéines oligomériques (Jones et Thornton, 1995). Chez *Escherichia coli* (*E. coli*), les protéines sont constituées en majorité de quatre sous-unités (Goodsell, 1991).

Les protéines oligomériques sont souvent rencontrées en raison des différents avantages qu'elles peuvent procurer par rapport aux protéines monomériques. Par rapport à une seule chaîne polypeptidique de grande taille, une protéine oligomérique permet de réaliser une économie de matériel génétique et de diminuer le risque d'erreur au cours des processus de réplication, transcription, traduction (Klotz *et al*, 1975). En effet, si l'on considère que la probabilité d'erreur est constante, une grande chaîne polypeptidique aura une plus forte probabilité de contenir une erreur qu'une protéine de petite taille. De plus, une protéine oligomérique après plusieurs cycles d'association et de dissociation peut éliminer la sous-unité mutée, augmentant ainsi la probabilité de donner un oligomère natif. Comme nous le verrons plus en détail dans le prochain chapitre, l'interaction entre sous-unités peut permettre de renforcer la stabilité de l'enzyme, de révéler et de réguler l'activité enzymatique. Elle peut aussi permettre d'augmenter la solubilité de la protéine et de diminuer la pression osmotique à l'intérieur de la cellule, bien que ce dernier point soit de plus en plus contesté (Schulz et Schirmer, 1979 ; Eisenstein et Schachman, 1989 ; Goodsell et Olson, 1993).

Différentes approches peuvent être utilisées pour appréhender le rôle de la structure quaternaire. Les interactions inter sous-unités peuvent être détruites en faisant varier différents facteurs physico-chimiques ou par mutagenèse dirigée et de nouvelles interfaces peuvent ensuite être créées entre des sous-unités différentes. Cela m'a conduit à étudier plus en détail la structure des interfaces entre sous-unités. Deux études complémentaires de la structure des interfaces sont détaillées : la première est une étude statistique et la seconde est une étude visuelle de chaque interface. Comme la structure de l'interface est généralement étroitement reliée au mécanisme d'association des sous-unités, qui constitue la dernière étape du repliement des protéines oligomériques, le mécanisme d'association des sous-unités sera brièvement abordé dans le chapitre suivant. Enfin, la GAPDH de *B. stearothermophilus*, qui a servi de modèle pour notre étude expérimentale, sera présentée dans le dernier chapitre.

II) Rôle de la structure quaternaire des protéines oligomériques.

II.1) Stabilité.

La structure quaternaire peut permettre d'augmenter la stabilité des protéines oligomériques. L'augmentation de la stabilité est plus ou moins importante suivant la protéine oligomérique étudiée. Dans les mêmes conditions, certaines protéines oligomériques sont très stables tandis que d'autres s'auto-dissocient. Cette augmentation de la stabilité peut, dans certains cas, être directement reliée à la stabilité des interfaces entre sous-unités.

Les différentes formes oligomériques de la lactate déshydrogénase illustrent bien cette propriété. Dans la plupart des organismes, la lactate déshydrogénase est isolée sous forme d'un homotétramère, qui peut en fait être décrit comme un « dimère de dimères ». Dans le cas de la lactate déshydrogénase (LDH) de porc, la structure tétramérique est stabilisée par un décapeptide situé en position N-terminale (Opitz *et al*, 1987). Le clivage, par protéolyse limitée, de ce décapeptide conduit à une enzyme isolée sous forme dimérique. Cette forme dimérique est beaucoup moins stable que l'enzyme native (Jaenicke *et al*, 1981 ; Girg *et al*, 1981) mais conserve une activité significative. La forme monomérique, qui est accessible en tant qu'intermédiaire de repliement, est, quant à elle, inactive et très peu stable (Jaenicke et Rudolph, 1980 ; Jaenicke, 1991).

La stabilité des protéines dimériques a été mesurée par des études de dénaturation à l'équilibre en présence de chlorure de guanidine et d'urée. Dans le cas des protéines dimériques qui se dénaturent suivant un processus à deux étapes, avec une transition entre l'état dimérique natif et l'état monomérique dénaturé, la contribution de la structure quaternaire à la stabilité du dimère a pu être déterminée en comparant la valeur de l'énergie libre déterminée lors de la dénaturation à l'équilibre avec celle associée à la dissociation en absence de dénaturant. Dans de nombreux cas, la plus grande stabilité des dimères est due aux interactions inter sous-unités. L'importance de la stabilisation varie en fonction de la taille de la sous-unité et dépend aussi du type de structures rencontrées à l'interface. La structure quaternaire peut contribuer à plus de 65% de la stabilité des protéines dimériques (Neet et Timm, 1994).

La triose phosphate isomérase (TIM) des archae hyperthermophiles *Pyrococcus woesei* et *Methanothermus fervidus* est un homotétramère de 100 kDa, contrairement à toutes les autres TIM de bactéries et d'eucaryotes qui sont des dimères de 48 à 60 kDa. La TIM de l'archae méthanogène, mésophile, *Methanobacterium bryantii* est elle aussi dimérique, indiquant que l'état tétramérique ne se retrouve pas chez toutes les archae mais qu'il serait plutôt à l'origine de la thermoadaptation

(Kohloff *et al*, 1996). La phosphoglycérate kinase isolée des mêmes archae hyperthermophiles possède elle aussi un nombre de sous-unités plus important que l'enzyme correspondante isolée d'organismes mésophiles, sous forme monomérique, suggérant là aussi que la structure quaternaire peut renforcer la stabilité de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation thermique (Kohloff *et al*, 1996).

La fructose 1,6-diphosphate aldolase A de muscle de lapin est un homotétramère dont les interfaces ont été déstabilisées par mutagenèse dirigée. Le remplacement du résidu Asp128 situé à l'interface par un résidu Gly, Ala, Asn, Gln ou Val conduit à la formation d'une enzyme dimérique qui possède les mêmes propriétés cinétiques que l'enzyme de type sauvage mais dont la stabilité thermique est plus faible (Tm diminué de 12°C) (Beernink et Tolan, 1994). Le double mutant (Q125D-E224A) de l'aldolase A est, quant à lui, isolé sous deux formes, tétramère et monomère, en équilibre. Le monomère conserve 72% de l'activité de l'enzyme de type sauvage mais sa stabilité vis-à-vis de la dénaturation par l'urée et la chaleur est plus faible (Beernink et Tolan, 1996). L'ensemble de ces résultats indique clairement que la structure quaternaire n'est pas nécessaire pour la catalyse et suggère que, dans ces cas, son rôle est d'assurer la stabilité de l'enzyme.

II.2) Activité.

Dans de nombreux cas, les sous-unités dissociées sont inactives. Cette absence d'activité peut être la conséquence d'une modification de la structure tertiaire et/ou secondaire des sous-unités par les conditions employées pour la dissociation ou elle peut être due au fait que le site actif est composé de résidus appartenant à des sous-unités adjacentes.

Chez certaines enzymes comme par exemple RecA (Nguyen *et al*, 1993), la phosphatase acide (Porvari *et al*, 1994) et la protéase du virus de l'immunodéficience acquise humaine (HIV) (Zutshi *et al*, 1998), la structure quaternaire est indispensable à la révélation de l'activité enzymatique. La dissociation de l'enzyme conduit à une perte totale d'activité, notamment dans le cas des enzymes dont le site actif chevauche les sous-unités comme par exemple la protéase du virus HIV. Cette dernière est une enzyme dimérique dont le site actif est composé de résidus appartenant à chaque monomère et les monomères isolés sont donc logiquement dépourvus d'activité (Wlodawer *et al*, 1989).

Chez d'autres enzymes, la structure quaternaire permet à l'enzyme d'acquérir une activité optimale. Les formes dissociées sont très peu actives et l'association des sous-unités permet d'augmenter fortement l'activité. Ce cas est illustré par la TIM de trypanosome. La TIM est une enzyme homodimérique dont le k_{cat} est limité par la diffusion à l'intérieur du site actif du substrat

négativement chargé (Wade *et al*, 1998). Les acides aminés catalytiques Lys13, His95 et Glu167 appartiennent à des boucles, boucle 1, 4 et 6 respectivement, situées à l'interface entre sous-unités (Noble *et al*, 1993). Dans l'enzyme de type sauvage, les boucles 1 à 4 adoptent une structure très rigide à cause de fortes interactions inter sous-unités. Différents mutants d'interface ont été produits, respectivement monoTIM (Borchert *et al*, 1994) et (T75R-G76E) (Schliebs *et al*, 1997). Ces deux mutants sont isolés sous une forme monomérique stable, qui possède une activité catalytique résiduelle avec un k_{cat} 1000 fois inférieur à celui de l'enzyme de type sauvage. Les données suggèrent que, malgré l'absence de la seconde sous-unité, les enzymes monomériques catalysent l'interconversion du D-G3P en dihydroxyacétone phosphate via le même mécanisme que l'enzyme de type sauvage (Schliebs *et al*, 1996). Le mutant monoTIM a été obtenu en remplaçant la boucle 3 par une boucle plus courte et plus hydrophile et les résidus Thr75 et Gly76 sont eux aussi localisés dans la boucle 3. La structure cristallographique à haute résolution montre que les boucles situées à l'interface ont des conformations différentes de celle de l'enzyme de type sauvage (Borchert *et al*, 1995 ; Thanki *et al*, 1997). La plus faible activité des mutants monomériques pourrait s'expliquer par la plus grande flexibilité des boucles du site actif. Les monomères possèdent donc des boucles flexibles, qui se rigidifieraient lors de la formation de l'interface provoquant ainsi une augmentation du k_{cat} d'un facteur 1000 et une diminution du K_M d'un facteur 10.

II.3) Régulation de l'activité enzymatique.

II.3.1) Régulation de l'activité par association-dissociation de l'enzyme.

N'importe quelle protéine oligomérique peut être dissociée pour peu que les conditions employées soient suffisamment dénaturantes. Le terme enzyme dissociable ne s'applique donc qu'aux enzymes qui se dissocient en réponse à un effecteur physiologique (Traut, 1994).

Environ 15% des protéines oligomériques se dissocient et se réassocient de façon réversible en réponse à un effecteur (Traut, 1988). Dans le métabolisme des carbohydrates et des nucléotides, où de nombreuses enzymes sont bien caractérisées, presque la moitié des enzymes allostériques sont des enzymes dissociables, quand elles sont testées *in vitro*. Mais, comme les expériences *in vitro* sont souvent réalisées dans des conditions éloignées des conditions physiologiques, cela ne veut pas obligatoirement dire que les enzymes auront le même comportement *in vivo*. Ce changement du nombre de sous-unités s'accompagne généralement d'un changement de l'activité enzymatique,

fournissant ainsi un mécanisme de régulation. Deux principaux modèles permettent de décrire ce changement de l'activité (Kurganov, 1982). Dans le premier modèle, l'activité catalytique dépend de la conformation de la sous-unité qui varie elle-même suivant la dissociation de l'enzyme. Par exemple, la forme dissociée peut avoir une conformation qui la rend inactive et les interactions inter sous-unités servent alors à la stabiliser dans une conformation active. Dans le second modèle, les sites régulateurs et catalytiques sont situés à l'interface entre sous-unités et sont détruits lors de la dissociation des sous-unités. Donc, n'importe quel facteur qui modifie l'équilibre entre les formes native et dissociée provoque une variation de l'activité. Il existe des enzymes où les sites régulateurs et catalytiques sont situés à l'interface entre sous-unités et d'autres où des études cinétiques suggèrent l'existence d'un site régulateur éloigné de l'interface dont l'affinité pour le substrat serait différente. Plus de 40 enzymes dissociables ont été caractérisées dans les trois voies métaboliques majeures : le métabolisme des carbohydrates, des nucléotides et des acides aminés. Plusieurs paramètres peuvent influencer la dissociation : la concentration en enzyme, la concentration en ligand, les autres protéines cellulaires, le pH et la température. Tous ces paramètres peuvent varier *in vivo* mais seuls les deux premiers paramètres varient *in vitro*. Comme la concentration en enzyme influence l'équilibre entre la forme oligomérique native et la forme dissociée, la dilution affecte l'activité spécifique de l'enzyme dissociable en changeant le rapport espèce active/espèce inactive. La dissociation provoquée par la dilution de l'enzyme est retrouvée chez de nombreuses enzymes dont l'AMP désaminase (Ellis *et al*, 1971), l'ATPase à Ca^{2+} (Kosk-Kosicka et Bzdega, 1988), la fumarase (Teipel et Hill, 1971), la phosphofructokinase (Bosca *et al*, 1985), l'isocitrate déshydrogénase (Giorgio *et al*, 1970) et l'UMP synthétase (Traut et Payne, 1980).

Dans le cas de la fumarase, le malate, produit de la réaction, stabilise le tétramère actif dans des conditions où la dilution devrait provoquer sa dissociation en dimère. La malate déshydrogénase (MDH), quant à elle, se dissocie en fonction de la concentration en Mg^{2+} et du pH. Les formes tétramérique, dimérique et monomérique sont actives mais possèdent des paramètres cinétiques différents (Iglesias et Andreo, 1990).

Quatorze pour cent des enzymes dissociables, dont la carbamoyl phosphate synthétase I dimérique de foie de rat (Lusty, 1981), sont plus actives sous la forme dissociée que sous leur forme oligomérique native. Dans les autres cas, les formes oligomériques sont les formes les plus actives, démontrant l'importance d'un équilibre régulé entre deux ou plusieurs états conformationnels pour l'activité .

II.3.2) Phénomènes de coopérativité, observés lors de la fixation d'un effecteur.

La régulation de l'activité enzymatique par des phénomènes de coopérativité, observés lors de la fixation d'un effecteur, est développée dans le chapitre V.1.2.3 page 32, en prenant la GAPDH de *B. stearothermophilus* comme modèle d'étude. Dans ce cas, l'état oligomérique reste inchangé lors de la transition allostérique. Ces phénomènes de coopérativité ne concernent qu'environ 30% des enzymes oligomériques (Traut, 1994).

II.4) Approches utilisées pour étudier le rôle de la structure quaternaire.

II.4.1) Etude de la dissociation.

Une première approche consiste à faire varier différents facteurs physico-chimiques tels que la pression, la température, le pH, la force ionique ou la concentration en ligands et effecteurs. La seconde approche s'appuie sur la connaissance de la structure tridimensionnelle des protéines et l'outil modélisation moléculaire, pour identifier et caractériser par mutagenèse dirigée les résidus impliqués dans les interactions inter sous-unités.

II.4.1.1) Etude de la dissociation de protéines oligomériques par une variation de différents facteurs physico-chimiques.

La dissociation d'une protéine oligomérique est la conséquence d'une modification de ses caractéristiques physico-chimiques telles que le volume, la charge ou la conformation. La pression exerce un impact surtout sur le volume, le pH et la force ionique sur la charge et la fixation des ligands sur la conformation de la molécule.

II.4.1.1.1) Dissociation de protéines oligomériques par la pression.

Contrairement à la température qui peut changer les interactions internes de la protéine d'une façon incontrôlée, la pression affecte les interactions internes uniquement par des variations des distances inter-atomiques, c'est-à-dire du volume de la protéine. Comme l'énergie totale du système reste constante, les effets de la pression sont plus faciles à interpréter que ceux de la température. Cette approche, bien que techniquement difficile à réaliser, occupe une place importante dans les études des protéines oligomériques (Masson, 1992; Silva et Weber, 1993; Gross

et Jaenicke, 1994). Les effets de la pression sur la stabilité des protéines sont gouvernés par le principe de Le Chatelier : l'augmentation de la pression produit une variation positive ou négative du volume ce qui entraine le déplacement de l'équilibre vers la rupture ou la formation des liaisons. Les interactions les plus sensibles à l'augmentation de la pression sont les interactions hydrophobes et électrostatiques dont la formation s'accompagne d'une augmentation du volume. En revanche, les liaisons hydrogène (liaisons H) sont pratiquement insensibles à la pression. La déprotonation de groupements chargés, la rupture de ponts salins et d'interactions hydrophobes, sous l'action de la pression, entraînent des changements conformationnels, structuraux et d'hydratation dans la protéine. En règle générale, les protéines oligomériques sont dissociées par des pressions relativement basses, en dessous de 2 kbar (Masson, 1992) alors que la plupart des protéines monomériques sont dénaturées entre 5 et 12 kbar (1 kbar = 100 MPa). La dissociation par la pression est généralement suivie par des techniques comme l'absorption UV-visible, la fluorescence et la RMN à haute résolution (Silva *et al*, 1996).

C'est ainsi que la LDH de muscle de porc est dissociée en un monomère inactif, sous l'effet d'une pression de l'ordre de 2 kbar (Schade *et al*, 1980).

Des études sur la GAPDH de levure utilisant les techniques de fluorescence ont permis de calculer les changements de volume intervenant pendant la réassociation de sous-unités préalablement dissociées à haute pression, et mettre ainsi en évidence l'existence de multiples conformations du tétramère natif en solution (Ruan et Weber, 1989).

Une autre technique, la ^{1}H-RMN à haute pression, a été utilisée pour étudier les changements structuraux du répresseur Arc (une petite protéine dimérique de 53 acides aminés, se fixant sur l'ADN) lors de sa dissociation par la pression (Peng *et al*, 1993). Il a été démontré, que le dimère natif est stabilisé par un feuillet β inter-monomère, impliquant les résidus 8 à 14 des deux sous-unités. Lors de la dissociation, il se forme au sein de chaque monomère obtenu, un feuillet β interne impliquant les mêmes résidus. L'interprétation des spectres RMN en une et deux dimensions suggère l'existence d'un changement conformationnel précédant la dissociation.

II.4.1.1.2) Dissociation de protéines oligomériques par la température.

La température est un facteur rarement employé dans les études de dissociation de protéines oligomériques car les variations de température produisent des changements simultanés de l'énergie totale et du volume de la protéine. La technique la plus courante utilise un cycle de congélation à l'azote liquide et décongélation. C'est ainsi que le monomère actif de l'isoenzyme de l'alcool déshydrogénase humaine $\beta_1\beta_1$ a été obtenu à partir du dimère natif. La basse température a permis

de déstabiliser la large interface hydrophobe qui maintenait le dimère (Ehrig *et al*, 1993). De basses températures couplées à de fortes pressions favorisent la dissociation des protéines oligomériques, en permettant de réduire l'entropie du système (Weber, 1995).

II.4.1.1.3) Dissociation par le pH, les sels et différents ligands.

La dissociation de protéines oligomériques peut être étudiée en fonction de ligands spécifiques et de différents facteurs chimiques tels que le pH, la force ionique, ou les agents chaotropes. Une variation du pH ou de la force ionique peut modifier l'état d'ionisation des chaînes latérales de la protéine et par conséquent, induire la rupture des liaisons H, créer des zones de répulsion de charges et séparer les paires d'ions. Les agents chaotropes tels que les sels de guanidinium et l'urée permettent aux molécules d'eau de pénétrer à l'intérieur de protéines et de solvater les chaînes latérales non polaires. L'urée est moins couramment employée car elle peut modifier la chaîne latérale de certains résidus. Ceci entraîne la rupture des interactions hydrophobes stabilisant la conformation native. La fixation de différents ligands peut conduire à des changements conformationnels dans la protéine, qui à leur tour peuvent déstabiliser la structure quaternaire et faciliter la dissociation en sous-unités.

C'est ainsi que la dihydrofolate réductase est un bon exemple pour l'étude de la dissociation en fonction de la variation du pH (Nichols *et al*, 1993). Dans cet homotétramère, les quatre résidus His62 proches dans l'espace se situent à l'interface dimère-dimère. La répulsion électrostatique existant à pH 5 entre les quatre His protonées provoque la dissociation du tétramère en dimère et la perte de l'activité biologique. A pH élevé, c'est-à-dire quand les quatre His sont non-protonées, le tétramère est obtenu, alors qu'à pH compris entre 5 et 8, on observe un équilibre rapide entre la forme tétramérique et la forme dimérique. La protonation du résidu His62 est donc responsable de la dissociation et de la perte d'activité.

Des expériences utilisant un gradient de pH ont permis dans le cas de la (*S*)-malate : $NADP^+$ oxydoréductase de foie de pigeon d'observer la dissociation consécutive du tétramère en dimère actif, puis en monomère actif (Huang et Chang, 1992). Les deux processus sont réversibles et ne se produisent pas au même pH. Les interactions stabilisant le dimère font intervenir un acide aminé dont le pKa de la chaîne latérale est d'environ 5,7 alors que dans le tétramère intervient un acide aminé dont le pKa de la chaîne latérale est de 7,2.

L'effet dissociant de la force ionique sur le tétramère de la GAPDH de muscle de lapin a été décrit depuis longtemps. Une température de 0°C entraîne une inactivation et une dissociation

réversible du tétramère natif de cette GAPDH soit en dimère soit en monomère, suivant les sels et la concentration de GAPDH utilisés (Constantinides et Deal, 1970). Le sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) et le chlorure de potassium (KCl) n'ont pas les mêmes effets : KCl a une plus grande capacité dissociante et déstabilise le tétramère plus fortement aux fortes concentrations en sels, alors que $(NH_4)_2SO_4$ déstabilise à une faible concentration (0,15 M) et stabilise à de plus fortes concentrations.

Différents ligands ont été testés et peuvent être classés en deux catégories : les ligands qui ont un effet dissociant et ceux qui, au contraire, ont un effet stabilisateur sur la structure oligomérique. L'incubation de la GAPDH de muscle de lapin avec l'ATP a été décrite comme provoquant la dissociation du tétramère actif en dimère inactif. Deux conditions sont nécessaires pour reformer un tétramère actif : l'élimination de l'ATP et l'ajout de NAD^+. A une concentration d'enzyme de 2 mg/ml, l'holoenzyme existe sous forme tétramérique, alors que l'apoenzyme est décrite comme constituée d'un mélange de tétramère et de dimère (Constantinides et Deal, 1969). Dans le cas de la GAPDH de levure, un effet stabilisateur du NAD^+ et de l'AMP cyclique, et un effet dissociant de l'ATP et de l'ADP est observé (Ruan et Weber, 1989). De plus, il a été constaté que le G3P favorise la dissociation de la GAPDH de muscle de lapin (Kalman *et al*, 1980).

II.4.1.2) Modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée.

L'étude de la dissociation de protéines en fonction de différents paramètres physico-chimiques ne permet que rarement de définir précisement un type d'interactions moléculaires, impliquées dans la relation structure quaternaire - fonction de la protéine. L'outil le mieux adapté pour le faire est la mutagenèse dirigée. La connaissance de la structure tridimensionnelle d'une protéine oligomérique permet d'identifier les résidus participant à la formation de différents types d'interactions stabilisatrices entre les sous-unités (liaisons H, ioniques, interactions hydrophobes, ...). De plus, la simulation des mutations potentielles permet de proposer par la suite le meilleur remplacement à réaliser expérimentalement.

II.4.1.2.1) Suppression d'interactions stabilisatrices.

La suppression de liaisons électrostatiques, hydrogène ou d'interactions hydrophobes s'établissant entre monomères grâce à des résidus situés à l'interface peut déstabiliser fortement la structure oligomérique et conduire à la dissociation de celle-ci.

Chez l'homodimère de la malate déshydrogénase d'*E. coli*, le résidu Asp45 participe à une interaction électrostatique à l'interface entre les deux monomères. Ce résidu qui n'interagit pas avec les résidus catalytiques a été muté en tyrosine. La liaison électrostatique stabilisatrice a ainsi été supprimée et un encombrement stérique a, de plus, été introduit à l'interface. Le mutant obtenu, D45Y est un monomère actif mais avec une activité spécifique d'environ 15000 fois inférieure à l'activité spécifique de l'enzyme native (Breiter *et al*, 1994).

II.4.1.2.2) Modification d'éléments de structure secondaire stabilisateurs.

La suppression ou l'altération de la conformation d'éléments de structure secondaire situés à l'interface des sous-unités et stabilisant la structure oligomérique peut conduire à la dissociation de la protéine.

La phosphoglycérate mutase de levure est un tétramère, alors que celle de vertébrés est un dimère. La comparaison des structures primaires de ces deux enzymes montre que la plupart des résidus impliqués dans la stabilisation des régions situées à l'interface inter sous-unités sont conservés, à la notable exception du résidu 168, qui est une lysine dans la forme tétramérique et une proline dans toutes les formes dimériques. Ce résidu Lys168 fait partie d'une hélice α et sa substitution par un résidu proline perturbe la structure secondaire locale, ce qui diminue les interactions entre les paires de dimères. Le mutant K168P est un dimère actif et le spectre de dichroïsme circulaire en UV lointain confirme une perte en pourcentage de structure en hélice α (White *et al*, 1993b).

II.4.1.2.3) Introduction de mutations déstabilisatrices.

L'introduction d'acides aminés chargés dans une zone hydrophobe de l'interface, de répulsion électrostatique et d'encombrement stérique à l'interface peut conduire à la déstabilisation de la protéine multimérique.

La comparaison de deux enzymes appartenant à la même famille, l'une étant tétramérique alors que l'autre est dimérique, a permis de mettre en évidence le rôle que jouent les facteurs stériques dans la déstabilisation d'une enzyme multimérique. Dans ce cadre, la famille d'enzymes LDH / malate déshydrogénase cytosolique (MDHc) offre un bon système expérimental. En effet, ces 2 enzymes présentent un mécanisme catalytique semblable et des sous-unités dont les structures tertiaires sont superposables. Les LDH sont des tétramères stables alors que les MDHc sont

généralement des dimères. Des études de modélisation moléculaire ont été réalisées et ont permis de localiser après superposition de la structure de la MDHc et de la LDH une large boucle en surface du dimère MDHc qui empêcherait de former un tétramère. Pour tester la validité de la modélisation, ces acides aminés ont été introduits dans la LDH et l'état dimérique de la LDH a été vérifié (Jackson *et al*, 1992).

La structure tridimensionnelle du mutant de la LDH de *B. stearothermophilus,* dans lequel une boucle supplémentaire a été introduite pour empêcher la tétramérisation de l'enzyme, a été résolue à 2,4 Å. Dans le cristal, l'unité répétée est le dimère. La boucle qui pointe dans le solvant est bien stabilisée par des liaisons H et empêche par encombrement stérique la formation du tétramère (Cameron *et al*, 1994).

II.4.1.2.4) Effets à longue distance.

La modélisation moléculaire est une méthode prédictive et l'effet de mutations plus ou moins éloignées de l'interface est quelque fois imprévisible. Dans certains cas, la perturbation du site actif peut conduire à des changements conformationnels à longue distance qui vont se répercuter sur les contacts intra et inter sous-unités. C'est notamment le cas du mutant H181A de la phosphoglycérate mutase de levure (White *et al*, 1993a). Pour étudier la dissociation de cette enzyme tétramérique, deux approches présentées ci-avant ont été combinées, la mutagenèse dirigée et l'action d'un ligand. L'His181 est située à proximité du site actif qui est entièrement composé d'acides aminés d'une seule sous-unité. Le mutant H181A présente une structure secondaire, tertiaire et quaternaire identique à celle de l'enzyme de type sauvage en absence de ligand. L'addition du cofacteur, 2,3-diphosphoglycérate, augmente la stabilité de l'enzyme sauvage vis-à-vis de la dénaturation par le chlorure de guanidinium, alors qu'elle modifie profondément la structure de l'enzyme mutée et provoque la dissociation du mutant en dimère et monomère. Il est clair que la perturbation du site actif (His181) conduit à des changements conformationnels à longue distance dans les contacts intra et inter sous-unités.

II.4.2) Formation d'hétéro-oligomères.

La création d'hétéro-oligomères, c'est-à-dire la création d'une nouvelle interface entre sous-unités différentes, a été très utile pour étudier les relations existant entre la structure quaternaire d'une protéine et sa fonction (Wente et Schachman, 1987). Cette appproche exploite l'une des

propriétés spécifiques des protéines oligomériques qui est la grande spécificité de reconnaissance des sous-unités. Dans le cas le plus simple, celui d'un hétérodimère, sa formation nécessite au préalable la dissociation des deux enzymes dimériques et l'immobilisation de l'un des deux partenaires. Plusieurs possibilités sont rencontrées : soit la complémentarité des surfaces entre monomères est suffisante pour assurer la stabilité de l'hétérodimère, soit elle ne l'est pas. Dans ce dernier cas, la stabilité de l'interface peut être renforcée au moyen d'interactions électrostatiques, de ponts disulfures ou par l'introduction de complémentarité stérique suivant le modèle « clé-serrure » (Ridgway *et al*, 1996 ; Zhu *et al*, 1996).

III) Structure des interfaces entre sous-unités.

La plupart des protéines solubles sont actives sous forme d'oligomères à faible nombre de sous-unités. L'étude des interfaces a pour but de déterminer les facteurs structuraux impliqués dans la stabilité de l'interface et dans la spécificité de reconnaissance des sous-unités afin de mieux comprendre le fonctionnement et la stabilité des protéines oligomériques. Deux types d'études peuvent être menées, une étude statistique et une étude visuelle de chaque interface. L'étude statistique d'une banque de structures cristallographiques à haute résolution est excellente pour quantifier la composition des interfaces : Janin *et al* (1988) ont ainsi déterminé que le pourcentage relatif de contacts polaires par rapport aux contacts apolaires est conservé par une large partie des interfaces inter sous-unités. Par contre, cette étude statistique a un inconvénient : du fait du grand nombre d'interfaces protéine-protéine prises en compte, elle a tendance à moyenner les facteurs structuraux. Pour assurer la stabilité des interfaces, les protéines oligomériques disposent de plusieurs possibilités et seule une étude visuelle de chaque interface permet d'accéder aux diverses solutions retenues. Cette étude visuelle de chaque interface composant la base de données est complémentaire de l'étude statistique, elle permet de relier les conclusions issues de l'étude statistique à la structure de chaque interface.

III.1) Etude statistique de la structure des interfaces.

Le but de cette étude est de définir les principes structuraux essentiels qui régissent les interactions inter sous-unités, à partir d'une banque de structures cristallographiques à haute résolution.

Sur la base des structures cristallographiques de l'insuline, de la trypsine et de l'hémoglobine, Chothia et Janin ont, dès 1975 (Chothia et Janin, 1975), défini le principe de base : l'hydrophobie joue un rôle majeur dans la stabilisation des associations protéine-protéine tandis que la complémentarité joue un rôle sélectif en décidant quelles protéines peuvent s'associer. Depuis, l'étude statistique de banques de structures cristallographiques beaucoup plus importantes a confirmé cette conclusion (Janin *et al*, 1988 ; Argos, 1988 ; Miller, 1989 ; Janin et Chothia, 1990 ; Korn et Burnett, 1991 ; Jones et Thornton, 1995, 1996, 1997 ; Tsai *et al*, 1996, 1997). Une interface typique est composée d'un cœur hydrophobe central entouré d'une région hydrophile chargée (Janin, 1988 ; Argos, 1988, Miller, 1989). Un certain nombre d'autres généralisations peuvent être faites ; elles sont décrites dans les paragraphes suivants.

III.1.1) Forme de l'interface.

Afin d'appréhender la forme des interfaces de différents homodimères, Jones et Thornton (1996) ont déterminé le caractère plus ou moins plan et le caractère plus ou moins circulaire de celles-ci. La forme, définie par le rapport de la longueur sur la largeur de l'interface, et le caractère plan de l'interface ont ainsi été étudiés. Environ 80% des interfaces étudiées par Argos (1988) et Jones et Thornton (1995) sont planes. Cela n'est pas surprenant, vu que dans de nombreux cas, les interfaces doivent répondre aux exigences de la symétrie. Dans le cas où l'interface n'est pas plane, chaque surface concave doit être complémentée par une surface convexe. Parmi les homodimères étudiés, dont l'interface n'est pas plane, se trouvent des protéines dont l'interface est constituée par l'entrelacement de fragments polypeptidiques appartenant à chaque sous-unité.

Les interfaces des 32 homodimères testés sont en général circulaires. Il n'existe pas de corrélation entre le caractère circulaire de l'interface et la forme du monomère ou la taille de la protéine. La glycoprotéine de surface de *Trypanosoma brucei* possède, quant à elle, une interface allongée qui reflète bien la forme et la fonction du dimère (Jones et Thornton, 1995).

III.1.2) Complémentarité géométrique de l'interface.

En général les interfaces inter sous-unités présentent une bonne complémentarité géométrique sans cependant atteindre une complémentarité maximale (Shoichet et Kuntz, 1991, 1993), en partie à cause de la présence de nombreuses cavités le long de l'interface entre sous-unités. Ces cavités sont en général plus grandes et plus souvent solvatées que les cavités

intradomaines mais présentent une préférence en acides aminés différente (Hubbard et Argos, 1994). La plupart des cavités sont remplies d'eau, l'eau représentant 63% du volume des cavités inter sous-unités, et les cavités vides ne constituent en moyenne que 3% de la surface entre sous-unités. Le volume des cavités situées à l'interface est d'environ 86 $Å^3$ pour les cavités solvatées et d'environ 28 $Å^3$ pour les cavités vides (Rashin *et al*, 1986 ; Hubbard *et al*, 1994). La surface des cavités est constituée d'un fort pourcentage de chaînes principales et possède un caractère polaire plus prononcé que la surface des cavités vides qui est essentiellement constituée de chaînes latérales non polaires. Dans les deux types de cavités, les acides aminés à chaîne latérale chargée et encombrante, en particulier les résidus arginine et lysine, sont défavorisés bien que le résidu arginine soit fréquemment rencontré dans les interfaces entre sous-unités. Ces cavités pourraient jouer un rôle structural et/ou fonctionnel en permettant notamment des réarrangements conformationnels inter sous-unités consécutifs à la fixation d'un ligand ou en augmentant la flexibilité de la structure quaternaire (Hubbard et Argos, 1994 ; Liang *et al*, 1998).

III.1.3) Motifs structuraux retrouvés à l'interface.

Les différentes structures secondaires, hélice α, feuillet β, coude β et boucle, sont représentées dans les interfaces, la présence d'hélice α étant la plus répandue (Argos, 1988 ; Jones et Thornton, 1995). L'interface est la combinaison de quatre motifs structuraux simples. Les trois premiers sont couramment utilisés à l'intérieur des monomères pour associer des structures secondaires tandis que le quatrième motif ressemble à un motif retrouvé à la surface extérieure des monomères :

(1) feuillet β étendu, constitué de feuillets β de chaque sous-unité qui forment un feuillet continu à travers l'interface.

(2) interaction entre feuillets β, le feuillet β d'une sous-unité venant s'empiler sur le feuillet β de la seconde sous-unité (Chothia et Janin, 1981).

(3) interaction entre hélices α (Chothia *et al*, 1981).

(4) interaction entre boucles.

Une interface typique possède l'un des trois premiers motifs structuraux en son centre, entouré par des interactions entre boucles où sont localisées la plupart des charges (Miller, 1989).

III.1.4) Symétrie.

La symétrie d'ordre 2 est couramment rencontrée : de nombreux oligomères sont construits comme des n-mères de dimères, les dimères possédant une symétrie d'ordre 2. Cette symétrie impose des contraintes structurales :

(1) les feuillets β de chaque sous-unité formant un feuillet β étendu à travers l'interface doivent être anti-parallèles.

(2) les surfaces des monomères constituant l'interface doivent être complémentaires, du point de vue géométrique (l'interface peut être plane ou vallonnée), des interactions polaires (liaisons H et électrostatiques) et hydrophobes.

(3) les contraintes géométriques imposées par la symétrie sont difficilement compatibles avec la géométrie des interactions entre hélice α et feuillet β couramment rencontrées à l'intérieur des protéines, ce qui les rend peu fréquentes à l'interface (Miller, 1989).

III.1.5) Présence d'un tunnel à l'interface (uniquement dans le cas des tétramères).

La présence d'un tunnel est assez fréquente dans les interfaces d'un tétramère et cela est dû à l'absence ou au très faible nombre de contacts entre deux dimères, à l'intérieur du tétramère. Ce tunnel peut jouer un rôle fonctionnel, comme dans le cas de la préalbumine où il peut fixer un effecteur.

III.1.6) Caractère hydrophobe de l'interface.

Typiquement, la composition atomique de la surface entre sous-unités possède une hydrophobie et une charge, qui sont intermédiaires entre celles de la surface extérieure d'un monomère et celles de l'interface entre structures secondaires enfouies au cœur de la protéine. En moyenne, les interfaces sont composées à 67% d'atomes non polaires, à 20% d'atomes polaires et à 13% d'atomes chargés (Janin *et al*, 1988 ; Argos, 1988 ; Korn et Burnett, 1991 ; Young *et al*, 1994 ; Jones et Thornton, 1995, 1996). Les acides aminés non polaires Ile, Leu, Phe, Val, Cys et Met contribuent pour 33% à la surface de l'interface tandis que les acides aminés chargés Asp, Glu et Lys y contribuent pour 14%. Le résidu arginine est le plus courant, après le résidu leucine. Les chaînes latérales encombrantes de certains résidus comme Trp, Tyr, Phe, Met, Arg et His, qui

pointent vers l'extérieur de l'interface et qui respectent la complémentarité stérique participent aussi à la stabilité de l'interface.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

III.1.7) Liaisons s'établissant à l'interface.

La liaison H est une interaction polaire qui s'établit, entre deux atomes, un donneur et un accepteur, via un atome d'hydrogène. Comme les atomes d'hydrogènes ne sont pas détectables dans les structures cristallographiques aux résolutions couramment atteintes (environ 1,5 Å), les liaisons H sont donc dénombrées et localisées à l'aide d'un programme. Celui-ci comporte généralement deux étapes : la première étape consiste à déterminer l'ensemble des atomes pouvant jouer le rôle de donneur de liaison H. La seconde étape consiste à déterminer les atomes pouvant jouer le rôle d'accepteur, selon les critères géométriques suivants : une distance entre atome donneur et accepteur inférieure à 3,9 Å, une distance entre l'atome d'hydrogène et l'atome accepteur inférieure à 2,5 Å, et un angle, formé entre l'atome donneur, l'atome d'hydrogène et l'atome accepteur, compris entre 110 et 250° (McDonald et Thornton, 1994). Le nombre de liaisons hydrogène est proportionnel à la surface de l'interface avec environ une liaison H pour 100 $Å^2$ (Hubbard *et al*, 1994 ; Jones et Thornton, 1995) et non pas une liaison H pour 200 $Å^2$ (Janin *et al*, 1988). Il existe néanmoins des protéines dont les interfaces sont dépourvues de liaisons H comme l'utéroglobine et la pyrophosphatase, qui sont toutes deux dimériques.

Soixante-dix-huit pour cent des liaisons polaires (hydrogène ou électrostatiques) se font entre chaînes latérales (Janin *et al*, 1988) et la majorité sont chargées avec 22% de liaisons électrostatiques et 35% de liaisons H formées entre un groupe chargé et un groupe neutre, que l'on appellera par la suite « liaisons hydrogène chargées ». Les « liaisons hydrogène chargées » s'établissent le plus souvent entre boucles, mais aussi entre boucle et hélice α et entre hélices α. Les interfaces qui contiennent de nombreux feuillets β ont tendance à avoir peu de « liaisons hydrogène chargées » et vice versa, avec comme exception la GAPDH. La géométrie des liaisons H formées à travers l'interface est moins optimale que celle des liaisons H formées à l'intérieur du monomère, d'où l'intervention de molécules d'eau qui permettent de former des liaisons H entre ces paires d'atomes donneur-accepteur non idéalement positionnées (Tsai et Nussinov, 1997).

Dans les protéines, il existe des groupements chargés positivement (groupement amino-terminal, chaîne latérale des résidus histidine, arginine et lysine) et négativement (groupement carboxy-terminal, chaîne latérale des résidus acide aspartique et glutamique). On considère que deux atomes de charge opposée peuvent former une liaison électrostatique si la distance les séparant

est inférieure à 4 Å (Barlow et Thornton, 1983). Le nombre de liaisons électrostatiques retrouvées à l'interface n'est pas proportionnel à la taille de celle-ci.

III.1.8) Interactions polaires et hydrophobes préférentiellement retrouvées à l'interface.

Beaucoup sont typiques des protéines comme les interactions entre les résidus arginine et aspartique ou entre les résidus valine et leucine, mais les acides aminés à chaîne latérale volumineuse comme les résidus aromatiques et le résidu arginine sont plus fréquemment impliqués dans des interactions entre résidus identiques (Met-Met, Phe-Phe, Leu-Leu et Asn-Asn) et dans des interactions polaires comme Ser-Asp et Tyr-Asp (Argos, 1988).

III.1.9) Fraction de la surface du monomère utilisée pour l'association avec les autres sous-unités.

La surface de l'interface, exprimée par sous-unité, a été calculée à partir de la différence entre la surface accessible du monomère isolé et celle du monomère à l'intérieur de l'oligomère (Lee et Richards, 1971). Pour former une interface, une sous-unité perd en moyenne 20% de sa surface accessible au solvant mais il existe de très fortes variations suivant les cas. Généralement, plus le nombre de sous-unités est important, et plus la sous-unité a tendance à enfouir une interface importante lors de l'association. L'aire de l'interface (exprimée par sous-unité) varie de 670 $Å^2$, soit 9% de la surface du monomère de la superoxide dismutase à 10570 $Å^2$, soit 40% de la surface du monomère de la catalase (Janin *et al*, 1988).

La surface accessible au solvant des sous-unités d'un oligomère possédant une petite interface est similaire à celle des protéines monomériques. Il a donc été suggéré que l'oligomère s'assemble à partir des monomères préformés. Dans le cas des oligomères qui possèdent une interface étendue, les sous-unités isolées exposeraient une large surface majoritairement hydrophobe au contact du solvant et seraient donc instables. Il a donc été suggéré que les sous-unités s'associaient via un intermédiaire multimérique (Janin *et al*, 1988).

Il n'existe pas de corrélation directe entre d'une part la surface de l'interface (exprimée par sous-unité) et d'autre part la masse moléculaire de la sous-unité, la surface accessible totale (Janin *et al*, 1988 ; Argos, 1988) ou la complémentarité de l'interface (Hubbard et Argos, 1994). Seule la

surface accessible de l'oligomère (S_a) est directement reliée à sa masse moléculaire (M) selon la relation : $S_a = 5{,}3 \times M^{0{,}76}$ (Miller *et al*, 1987a et b).

III.1.10) Autres facteurs stabilisant l'interface.

III.1.10.1) Molécules d'eau.

Les molécules d'eau situées à l'interface permettent, dans certains cas, de former des liaisons H entre :

- des paires d'atomes non complémentaires, entre atomes donneurs ou entre atomes accepteurs de liaisons H.
- des paires constituées d'un atome donneur et d'un atome accepteur non idéalement positionnés (Tsai et Nussinov, 1997).

III.1.10.2) Les ponts disulfures.

Les ponts disulfures sont dénombrés et localisés à l'aide d'un programme (McDonald et Thornton, 1994) qui considère qu'un pont disulfure existe à partir du moment où la distance séparant les atomes de soufre de deux résidus cystéine est inférieure à 3 Å.

Les ponts disulfures sont formés dans un environnement oxydant et sont donc retrouvés dans certaines protéines cellulaires localisées dans la membrane ou dans l'espace périplasmique où ils contribuent aux propriétés structurales. Les ponts disulfures s'établissant au niveau des interfaces sont peu fréquents (Thornton, 1981). Ils jouent alors un rôle important dans la stabilisation de la structure de la protéine. Ceci a pu être confirmé par l'introduction de ponts disulfures inter sous-unités par ingénierie protéique (Prestrelski *et al*, 1994 ; Gokhale *et al*, 1994). L'interface de l'utéroglobine, protéine dimérique et extracellulaire, contient deux ponts disulfures dont le rôle est d'assurer la stabilité de la structure (Morize *et al*, 1987). La glutathione réductase est l'une des rares protéines intracellulaires à contenir un pont disulfure entre sous-unités. En général, les ponts disulfures retrouvés chez les protéines intracellulaires ont d'autres rôles que de stabiliser la structure, et dans le cas de la glutathione réductase le pont disulfure a une fonction catalytique (Schulz *et al*, 1982).

III.1.11) Récapitulatif des conditions à remplir pour que la surface d'un monomère forme une interface.

A partir de la description précédente de l'interface, il est possible de récapituler les conditions que la surface d'un monomère doit remplir pour pouvoir former une interface. La surface du monomère doit :

(1) contenir l'un des trois motifs structuraux décrits au paragraphe III.1.3. qui formera le centre de l'interface.

(2) être auto-complémentaire du point de vue :

- géométrique : elle doit être plane ou s'il existe une partie convexe à une extrémité du monomère, il doit y avoir une partie concave à l'autre extrémité.
- des liaisons polaires (liaisons H ou électrostatiques) : s'il existe un groupement donneur à une extrémité du monomère, il doit y avoir un groupement accepteur à l'autre extrémité.
- des interactions hydrophobes.

(3) posséder une charge intermédiaire entre la charge de l'intérieur et celle de l'extérieur de la protéine monomérique. La distribution de charge devra être telle que le centre de l'interface sera majoritairement hydrophobe et la périphérie plus hydrophile, avec la majorité des charges.

III.2) Etude visuelle de la structure de chaque interface.

Une étude visuelle de l'interface de 136 homodimères, dont la structure cristallographique à haute résolution a été extraite de la banque Brookhaven Protein Data Bank, a été récemment réalisée par Larsen *et al* (1998). Elle avait pour but de décrire les différentes structures utilisées pour stabiliser les interactions inter sous-unités de ces homodimères.

III.2.1) Les différents types d'interface rencontrés.

III.2.1.1) Interfaces classiques.

L'interface classique est présente dans une minorité (un tiers) des homodimères étudiés. Elle est constituée d'un unique cœur hydrophobe continu, qui occupe une partie significative de sa surface et qui est entouré d'une région hydrophile chargée (Miller, 1989).

III.2.1.2) Interfaces sans cœur hydrophobe.

Les deux tiers des homodimères restants présentent des petits amas hydrophobes (composés en moyenne de 1 à 3 acides aminés), des liaisons H et électrostatiques et des molécules d'eau, répartis sur toute la surface de l'interface. L'absence de cœur hydrophobe n'est pas corrélée à une fonction particulière (Larsen *et al*, 1998). Il existe une grande variété dans ces interfaces mixtes : quelques-unes des interfaces les plus étendues sont presque entièrement hydrophiles, à l'image de celle de l'adényl-succinate synthétase. Les contacts hydrophobes les plus importants qu'elles établissent sont des interactions stériquement complémentaires suivant le modèle clé-serrure via un seul résidu hydrophobe. Dans d'autres interfaces, à l'image de celles des ARNt synthétases, les amas hydrophobes et polaires sont plus nombreux et sont composés de 4 à 6 résidus. Par contre, la superoxyde dismutase possède l'une des plus petites interfaces mixtes avec 2 liaisons H, 6 interactions hydrophobes et quelques molécules d'eau.

III.2.1.3) Interfaces entrelacées.

Dix des protéines étudiées par Larsen *et al* (1998) présentent une interface constituée de l'entrelacement d'une partie de la chaîne polypeptidique de chaque sous-unité. Ces structures sont un exemple de l'échange de domaine, décrit pour la première fois dans le cas de la toxine diphtérique (Bennett *et al*, 1994). L'échange de domaine se produit quand un domaine appartenant à une protéine composée de plusieurs domaines est remplacé par un domaine identique qui appartient à une autre sous-unité (Bennett *et al*, 1995). Cette structure peut conduire à une interface très stable, si les domaines échangés sont étendus, ou à un équilibre entre une forme dimérique et une forme monomérique, si seuls de courts fragments sont échangés (Schlunegger *et al*, 1997). Dans le cas de la toxine de la diphtérie, l'interface entre sous-unités est majoritairement polaire et fortement

hydratée, ce qui permet d'expliquer qu'elle puisse exister sous deux formes, monomère et dimère en équilibre.

Les protéines dimériques étudiées, dont certaines cytokines extracellulaires et quelques protéines se liant à l'ADN comme les répresseurs arc, met, mnt et trp, possèdent des interfaces complexes avec une extension de la chaîne polypeptidique de la première sous-unité qui interagit avec la seconde sous-unité. Dans ces exemples, il est probable que les deux chaînes polypeptidiques se replient et s'associent via un intermédiaire multimérique. En effet, l'interface se rapproche fortement des caractéristiques de l'intérieur de la protéine : elle est très hydrophobe et les motifs structuraux rencontrés ressemblent plus à ceux retrouvés à l'intérieur de la protéine. Les dimères ainsi formés sont symétriques.

III.2.2) Molécules d'eau à l'interface.

Dans l'étude de Larsen *et al* (1998), les interfaces sont relativement hydratées. La plupart des molécules d'eau sont réparties sur toute la surface de l'interface, l'accumulation de molécules d'eau en amas représentant une exception. Ces observations rejoignent celles de Hubbard et Argos (1994). Il est à noter que le taux d'hydratation à l'intérieur des structures cristallographiques extraites de la Brookhaven Protein Data Bank varie considérablement en fonction de la résolution, de la méthode et de la qualité de l'affinement.

III.2.3) Conséquences au niveau du repliement et de l'association des sous-unités.

De nombreuses études sur les interfaces sont menées car leurs auteurs pensent que les résultats permettront de comprendre et de prédire les mécanismes de repliement et d'association des protéines oligomériques.

Pour prédire la stabilité des protéines oligomériques, des modèles fondés sur l'étude des structures cristallographiques ont été construits. Les modèles classiques, fondés sur le calcul des surfaces (Wesson et Eisenberg, 1992) suggèrent qu'un large cœur hydrophobe continu stabilise autant la protéine, à surface égale, que des amas hydrophobes dispersés. Mais la validité de cette suggestion n'a pas encore été démontrée. De la même façon, l'hypothèse selon laquelle la structure finale native d'une protéine reflète les principaux aspects de son mécanisme de repliement n'a pas encore été définitivement démontrée. A partir de l'étude de l'interface de 355 protéines, Tsai et Nussinov (1997) ont divisé les protéines en trois grandes classes suivant qu'elles se replieraient

plutôt suivant un processus à 2 ou 3 étapes. Dans le processus à deux étapes, il y a passage direct du monomère dénaturé à l'oligomère replié, sans passer par le monomère replié. Dans le processus à trois étapes, l'association des sous-unités se fait *via* le monomère replié. Les trois classes de protéines définies par Tsai et Nussinov (1997) correspondent aux trois classes d'interfaces définies par Larsen *et al* (1998). La première classe regroupe 231 protéines (65%) où l'interface est fortement polaire et hydratée et qui correspondent aux protéines à interface sans cœur hydrophobe. Ces protéines se replieraient selon un mécanisme à trois étapes. La seconde classe regroupe 69 protéines (25%) correspondant aux protéines avec une interface classique, qui se replieraient selon un mécanisme à deux étapes. La troisième classe regroupe 35 protéines (10%) correspondant aux protéines avec une interface entremêlée qui se replieraient selon un mécanisme à deux étapes. Malheureusement, les résultats expérimentaux n'ont pas permis de relier aussi clairement la structure native de l'oligomère à son mécanisme de repliement, c'est-à-dire selon un mécanisme à deux ou trois étapes. Il faut notamment savoir que le mécanisme général du repliement inclut plusieurs étapes (Goldberg, 1985) et que plusieurs de ces étapes ne pourront pas être observées si l'étape suivante est suffisamment rapide.

IV) Repliement et association des sous-unités.

Dans le cas des protéines oligomériques, il faut, en plus du processus de repliement, prendre en compte le processus d'association des sous-unités. Dans cette partie nous nous intéresserons plus particulièrement au processus d'association des sous-unités. Ces deux processus doivent être coordonnés dans le temps parce que la formation de la structure quaternaire native nécessite que la surface des monomères servant à la reconnaissance spécifique des sous-unités soit préalablement formée. Le repliement de chaque sous-unité isolée, processus uni-moléculaire, et l'association de ces sous-unités, processus généralement bi-moléculaire, sont donc deux réactions consécutives (Jaenicke et Rudolph, 1986 ; Jaenicke, 1998). Il n'existe pas de schéma général décrivant le repliement et l'association des sous-unités des différentes protéines oligomériques. Cela n'est pas surprenant vu la diversité des structures quaternaires rencontrées dans les protéines. Mais, même des protéines homologues qui possèdent des structures quaternaires très voisines, peuvent s'assembler suivant différents mécanismes (Teschke et King, 1992).

IV.1) Mécanismes d'association des sous-unités.

IV.1.1) Association des sous-unités sans passer par un intermédiaire multimérique.

Dans ce cas, le monomère natif, c'est-à-dire structuré, est en équilibre avec la forme oligomérique. Les premières étapes du repliement de la protéine oligomérique sont pratiquement identiques à celles des protéines monomériques. En effet, des segments définis de la chaîne polypeptidique correspondant à la sous-unité isolée vont, suivant un processus hiérarchique, former des éléments de structures secondaires, puis de super-structures secondaires, se transformer en sous-domaines et en domaines qui vont ensuite former un monomère dont la structure tertiaire est proche de celle qu'il possède à l'intérieur de l'oligomère (Murry-Brelier et Goldberg, 1989 ; Baldwin et Rose, 1999a et b). Cette structure tertiaire fournit le site d'interaction qui permet l'association spécifique des sous-unités. Au cours de l'étape suivante, les sous-unités associées subissent des changements conformationnels supplémentaires qui conduisent à la structure quaternaire native. Ces réarrangements intramoléculaires subis par l'oligomère ont pour but de renforcer la compacité de sa structure, d'expulser les molécules d'eau de l'interface entre sous-unités et de minimiser la surface hydrophobe exposée au contact du solvant (Richards, 1977 ; Wodak *et al*, 1987 ; Jaenicke, 1987 ; Janin *et al*, 1988 ; Kim et Baldwin, 1990). L'oligomère formé peut ensuite, suivant les cas, subir une étape d'isomérisation supplémentaire pour donner un oligomère actif du point de vue enzymatique. Le repliement et l'association des sous-unités peuvent donc être suivis de plusieurs étapes assimilées à des réactions de premier ordre, de façon à ce que, dans le cas le plus simple à savoir la formation d'un dimère, ils puissent être décrits sous la forme d'une réaction séquentielle (uni-uni-bi-uni)-moléculaire : $2M \longrightarrow 2M' \longrightarrow 2M \longrightarrow M_2 \longrightarrow M_2^*$ avec, M : monomère non structuré, M' : monomère partiellement structuré, M : monomère structuré, M_n^* : oligomère natif (Jaenicke, 1987, 1995, 1998).

IV.1.2) Association des sous-unités via un ou plusieurs intermédiaires multimériques.

Dans le processus de renaturation des déshydrogénases multimériques, les chaînes polypeptidiques s'associent via des intermédiaires multimériques. L'agrégation de ces intermédiaires entre en compétition avec les processus de repliement et d'association des sous-unités. La quantité de protéine native et d'agrégats formés au cours de la réaction de renaturation *in*

vitro varie donc fortement en fonction de la concentration de ces intermédiaires (Jaenicke et Rudolph, 1989 ; Jaenicke, 1998).

Le répresseur tryptophane est un homodimère dans lequel les hélices α situées dans la partie N-terminale de chaque chaîne polypeptidique sont entrelacées dans la structure native et pour lequel des intermédiaires de repliement ont été mis en évidence (Gittelmam et Matthews, 1990). Les fragments N-terminaux de chaque chaîne polypeptidique, structurés en hélices α, s'associent puis les fragments C-terminaux s'associent et se replient à leur tour pour donner naissance à la protéine native (Tasayco et Carey, 1992).

La luciférase bactérienne est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques α et β, qui se replient et se dimérisent d'une façon concertée *in vivo*. Les deux polypeptides exprimés individuellement, une fois mélangés sont incapables de s'associer (Waddle *et al*, 1987). Par contre, s'ils sont dépliés avant d'être mélangés, ils forment un dimère actif. Les deux chaînes polypeptidiques doivent donc interagir durant le processus de repliement et au moins l'une des deux sous-unités adopte, quand elle se replie séparément, une conformation qui ne permet pas l'interaction avec la seconde sous-unité. La partie C-terminale de la sous-unité β serait responsable de ce phénomène (Sugihara et Baldwin, 1988).

La protéine de la queue du bactériophage P22 est l'un des exemples de formation d'une protéine oligomérique via des intermédiaires de repliement les mieux documentés *in vivo* et *in vitro* (Fuchs *et al*, 1991). La protéine native est un homotrimère thermostable, résistant aux détergents et aux protéases. L'homotrimère natif est formé via un intermédiaire monomérique partiellement replié et à longue durée de vie qui s'associe pour former un intermédiaire trimérique partiellement replié où les chaînes polypeptidiques sont associées mais pas totalement structurées (Seckler *et al*, 1989). L'intermédiaire monomérique est thermolabile et il est le précurseur de corps d'inclusion à température élevée (Haase-Pettingell et King, 1988).

IV.1.3) Association des sous-unités via des espèces métastables.

Une espèce métastable est plus stable que ses propres intermédiaires de repliement mais n'est pas totalement native (Janin, 1991). Cette forme métastable est soluble et va, en solution, s'associer à un complexe oligomérique ce qui va provoquer chez elle des changements conformationnels coopératifs. Sa conformation à l'intérieur de l'oligomère est donc différente de celle qu'elle adopte en solution.

Le flagelle de certaines bactéries est constitué par la polymérisation de monomères à l'extrémité distale du filament. Cette polymérisation se produit aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. La

formation du flagelle est constituée de deux phases : une phase de nucléation suivie d'une phase de croissance (Asakura, 1968). In vitro, la phase de croissance, c'est-à-dire d'allongement du polymère, est divisée en deux étapes. Au cours de la première étape, le monomère de flagelline se fixe sur le polymère de façon réversible. Au cours de la seconde étape, le monomère subit des changements conformationnels qui lui permettent de s'incorporer dans le flagelle et de fixer le monomère suivant (Asakura, 1968). En solution, le monomère de flagelline possède des régions N- et C-terminales désordonnées et très mobiles alors que durant la formation du polymère, ces deux régions se structurent en hélice α (Ishima *et al*, 1991 ; Vonderviszt *et al*, 1991).

IV.2) Spécificité de reconnaissance des sous-unités.

Quel que soit le mécanisme d'assemblage de la protéine, le processus d'agrégation entre en compétition avec la formation de la structure quaternaire native. Dans la cellule, le processus de repliement d'un certain nombre de protéines fait donc intervenir des protéines accessoires qui sont décrites comme assistant le repliement plutôt que comme le dirigeant (Freedman, 1992 ; Jaenicke, 1996 ; Jaenicke, 1998). Elles sont impliquées dans la catalyse des étapes dont la vitesse limite le repliement. La peptidyl prolyl cis-trans isomérase (PPI) est une enzyme ubiquitaire, retrouvée depuis les bactéries jusqu'aux mammifères, qui catalyse l'isomérisation de la proline de la forme trans vers la forme cis. La protéine disulfure isomérase (PDI) et son équivalent DsbA chez *E. coli*, catalysent l'échange des ponts disulfures. Chez *E. coli*, le mécanisme d'action des protéines chaperones DnaK, DnaJ et GrpE et des chaperonines GroEL-GroES est connu (Hartl, 1996 ; Frydman et Höhfeld, 1997 ; Rüdiger *et al*, 1997 ; Fenton et Horwich, 1997 ; Netzer et Hartl, 1998). Ces protéines, en se fixant de façon transitoire aux chaînes polypeptidiques non natives, empêchent l'agrégation.

L'une des particularités des protéines oligomériques est la grande spécificité de reconnaissance des sous-unités lors de la réaction d'association qui est due à la complémentarité des interactions entre les surfaces des sous-unités. Cette complémentarité se retrouve au niveau de la forme des interfaces, des interactions hydrophobes, des groupements donneurs et accepteurs de liaisons H ou électrostatiques. L'une des conséquences de cette grande spécificité de reconnaissance des sous-unités, est l'absence de formation de protéine chimérique, comme cela a été démontré *in vitro* après une reconstitution synchrone d'enzymes oligomériques à partir de deux enzymes de structures très proches, en l'occurrence la LDH et la MDH (Cook et Khosland, 1969 ; Jaenicke, 1998). Cette propriété est essentielle car, *in vivo*, le repliement de la chaîne polypeptidique correspondant à la protéine oligomérique a lieu en présence de très fortes concentrations d'autres

protéines, les chaînes polypeptidiques codées par le même gène ne représentant qu'une faible fraction des protéines présentes.

V) La GAPDH phosphorylante de *Bacillus stearothermophilus* : un bon modèle d'étude.

Pour notre étude expérimentale du rôle de la structure quaternaire, nous avons choisi comme modèle la GAPDH phosphorylante de *B. stearothermophilus*. Cette enzyme possède des interfaces classiques, qui répondent à la définition du paragraphe III.2.1.1. et qui sont décrites plus en détail dans la suite de ce chapitre.

V.1) Structure tridimensionnelle.

La GAPDH est une enzyme tétramérique de sous-unités identiques d'environ 330 acides aminés. Chaque sous-unité fixe le cofacteur NAD.

De nombreuses structures cristallographiques de GAPDH sous forme holoenzyme ont été décrites mais seules les structures de GAPDH de muscle de homard (Buehner *et al*, 1974 ; Moras *et al*, 1975), de muscle humain (Watson *et al*, 1972; Mercer *et al*, 1976), de *B. stearothermophilus* (Skarzynski *et al*, 1987), de *Trypanosoma brucei* (Vellieux *et al*, 1993), de *Thermotoga maritima* (Korndörfer *et al*, 1995), de *Thermus aquaticus* (Tanner *et al*, 1996), d'*E. coli* (Duée *et al*, 1996), de *Leishmania mexicana* (Kim et Hol, 1998) et de *Palinurus versicolor* (Song *et al*, 1998) ont été suffisamment affinées, avec des résolutions de respectivement 2,9, 3,5, 1,8, 3,2, 2,5, 2,5, 1,8, 2,8 et 2. La structure cristalline sous forme apoenzyme a également été résolue à respectivement 3 et 2,5 Å pour la GAPDH de muscle de homard (Murthy *et al*, 1980) et de *B. stearothermophilus* (Skarzynski et Wonacott, 1988). Dans le cas de la GAPDH de *Saccharomyces cerevisiae*, les données ont été collectées à 2,1 Å (Gilboa *et al*, 1998).

V.1.1) Structure du monomère.

Chaque sous-unité est composée de deux domaines : un domaine de fixation du cofacteur et un domaine catalytique (figure 1 page 26a). Comme dans toutes les autres GAPDH connues, aucune liaison ionique ne relie un résidu du domaine catalytique à un résidu du domaine de fixation du cofacteur, probablement pour permettre un mouvement aisé du domaine du cofacteur par rapport au

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

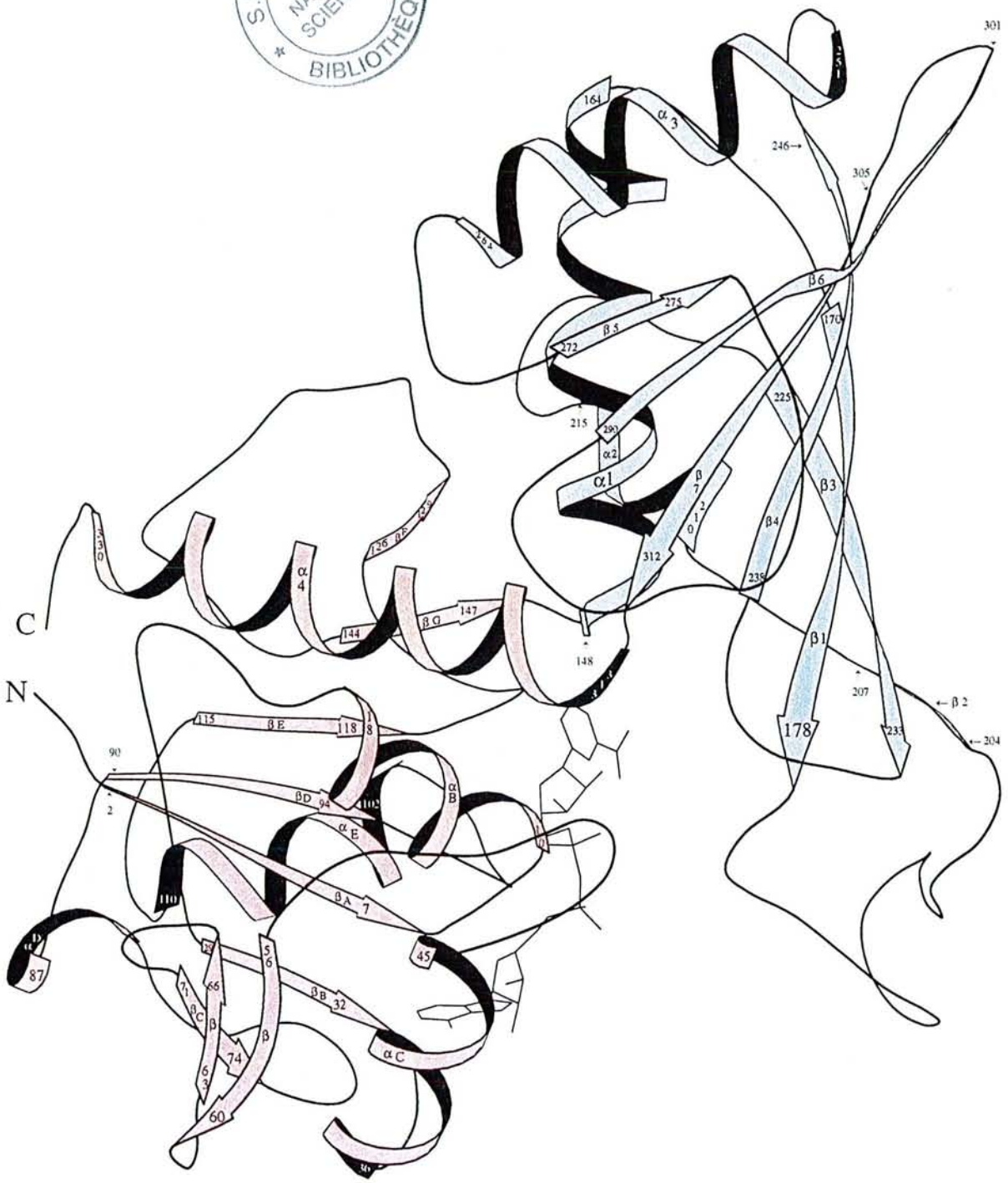


Figure 1 : Modèle en "rubans-flèches" de la structure du monomère O de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous forme holo.

Les coordonnées sont extraites du fichier PDB 1gd1 (Skarzynski *et al*, 1987). Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991).

domaine catalytique lors de la fixation du NAD. En revanche, plusieurs liaisons H relient ces deux domaines. La relative indépendance des domaines catalytique et de fixation du NAD de la GAPDH de *B. stearothermophilus* est illustrée par le fait que le domaine du cofacteur peut être obtenu isolément, par une approche d'ingénierie protéique, sous forme d'une chaîne polypeptidique continue et structurée (Levashov *et al*, 1999) comme dans le cas de la GAPDH de *Thermotoga maritima* (Jecht *et al*, 1994).

V.1.1.1) Topologie des deux domaines structuraux.

Le domaine de fixation du cofacteur est constitué des résidus 1 à 148 arrangés en 9 brins β essentiellement parallèles (β_A, β_B, β', β'', β_C, β_D, β_E, β_F et β_G) et de quatre hélices α (α_B, α_C, α_D et α_E) formant un repliement dit de Rossmann, qui représente un motif caractéristique des sites de fixation de cofacteur de nombreuses déshydrogénases (Rossmann *et al*, 1974). L'hélice α C-terminale (α_4) constituée des résidus 313 à 330 se replie sur le domaine N-terminal, et vient établir un contact direct avec le NAD. Ce domaine peut être divisé en deux sous-sites engagés dans des interactions avec les différentes parties de la molécule de NAD : le sous-site de fixation de l'adénosine et le sous-site de fixation du nicotinamide (figure 2 page 27a).

Le domaine catalytique est constitué des résidus 149 à 312. Il est formé de 3 hélices α (α_1, α_2, α_3), de 7 brins β (β_1, β_2, β_3, β_4, β_5, β_6, β_7) organisés en un feuillet antiparallèle et de la boucle S (résidus 179 à 201), région sans structure secondaire particulière à caractère hydrophobe, qui est présente à l'interface des sous-unités dans le tétramère. Cette boucle assure en partie la formation et le maintien de la structure quaternaire de l'enzyme. De plus, les interactions qu'elle établit avec le NAD ont laissé supposer qu'elle pourrait être impliquée dans la sélectivité de reconnaissance du cofacteur via les résidus Leu187 et Pro188 (Skarzynski *et al*, 1987 ; Corbier *et al*, 1990a ; Didierjean *et al*, 1997).

Le site catalytique renferme les résidus catalytiques : Cys149 et His176 ainsi que les résidus impliqués dans la fixation des substrats : le D-G3P et le phosphate inorganique (Pi) et du produit : le 1,3dPG. La présence de deux sites de reconnaissance anionique est donc nécessaire.

V.1.1.2) Mode de liaison du cofacteur. Conséquences de la transition apo-holo.

La fixation du NAD sur la GAPDH provoque d'importants changements conformationnels. La comparaison des structures tridimensionnelles apo et holo de la GAPDH de

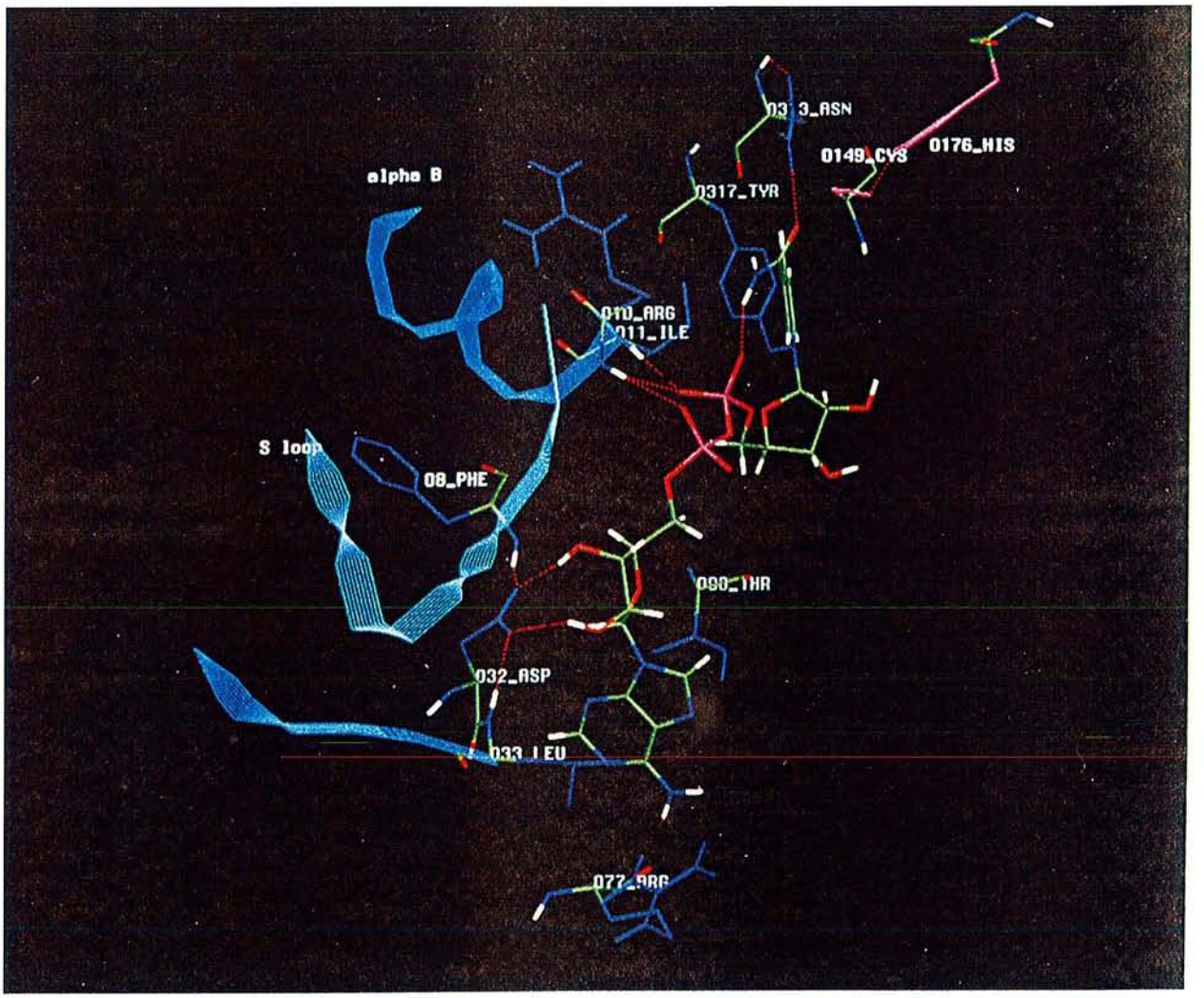


Figure 2 : Le site de fixation du NAD dans la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Skarzynski *et al*, 1987).

Le NAD et les chaînes principales des acides aminés sont représentés en couleurs atomiques conventionnelles (C, vert ; O, rouge ; N, bleu ; P, rose ; H, blanc). Seuls les atomes d'hydrogène polaires sont représentés. Les chaînes latérales des résidus participant à la liaison du NAD sont en bleu foncé, celles des deux résidus catalytiques, Cys149 et His176, en rose. En mode ruban bleu clair sont également représentés l'hélice α_B et la boucle β_B -α_C, et en mode ruban bleu clair un fragment de la boucle S (résidus 186 à 193). La Ser119 et l'Asn 180 ne sont pas indiquées pour des raisons de clarté. Le cycle nicotinamide est présenté de "profil", ce qui met en évidence la déviation du groupement carboxamide en C_3 hors du plan du cycle. Le réseau de liaisons H formé autour de l'Asp32 est également apparent.

B. stearothermophilus a conduit Skarzynski et Wonacott (1988) et Duée *et al*, (1996) à proposer le mécanisme suivant qui permet la mise en place séquentielle des différentes interactions.

Mise en place des interactions Enzyme-NAD.

- La partie ADP du NAD se fixe en premier sur l'apostructure mettant en place l'essentiel de ses interactions. L'adénosine, en conformation anti, est enfouie dans une poche hydrophobe formée des chaînes latérales de la Leu33 et de la Thr96. Elle est stabilisée par liaison H entre le NH_2 en C_6 et le carbonyle peptidique de l'Arg77. L'Asp32 (résidu invariant responsable de la sélectivité de reconnaissance du NAD) engage des liaisons H avec les groupements OH en position 2' et 3' du ribose via les oxygènes du carboxylate de sa chaîne latérale, alors que l'atome OD2 engage une liaison H avec la chaîne latérale de la Thr34. La partie nicotinamide, non liée, est cependant favorablement orientée pour interagir avec son site. C'est la conformation apo ou ouverte.

Le pyrophosphate (PPi) est stabilisé par interaction électrostatique avec la charge positive partielle générée par le macrodipôle de l'hélice α_B, et par deux liaisons H établies entre les atomes AO2 et NO2 et les NH peptidiques respectivement des résidus Arg10 et Ile11.

- Un ensemble de changements conformationnels se produit alors pour conduire à la conformation holo ou fermée. Ces changements sont décrits ci-dessous.

Déduits de la comparaison des structures cristallographiques obtenues à moyenne résolution, ces changements conformationnels consistent en une rotation de 5,5° des éléments $\beta_A\alpha_B\beta_B$ et de l'hélice α C-terminale, qui lient le NAD, par rapport au domaine catalytique (4,3° en moyenne pour l'ensemble du domaine du cofacteur (Leslie et Wonacott, 1984)).

Ces changements conformationnels ont été décrits plus en détail, grâce à la structure cristallographique obtenue à haute résolution, comme étant des rotations locales de sous-domaines à l'intérieur du domaine de fixation du cofacteur, accompagnées d'une rotation des dimères (O-P) et (Q-R) l'un par rapport à l'autre d'environ 2° (Skarzynski et Wonacott, 1988). La rotation de ces deux dimères a été décomposée en deux rotations : le dimère (O-P) tourne autour de l'axe *P* d'environ +1° et le dimère (Q-R) tourne dans la direction opposée d'environ –1° (Duée *et al*, 1996). Pour ce faire, un ensemble d'environ 60 résidus (15 dans chaque sous-unité), dont la position des carbones α reste inchangée dans les formes apo et holoenzyme, a été défini comme le cœur fixe du tétramère autour duquel se produisent les changements conformationnels accompagnant la transition apo-holo. Ce cœur est essentiellement composé des brins β (β_1, β_3, β_4 et β_8) appartenant au feuillet β du domaine catalytique qui constitue les interfaces entre les sous-unités O et P et entre

les sous-unités R et Q. Dans ce mouvement, les brins centraux (β_1, β_3, β_4 et β_8) des domaines catalytiques de chaque sous-unité restent fixes et la rotation se fait par une variation des angles dièdres des résidus situés aux deux extrémités de ces brins. Il est à noter que la conformation de la boucle S de la forme apo est très proche de celle de la forme holo. La différence qui existe entre la structure de la forme holo et la structure de la "forme intermédiaire", résultant de la rotation des dimères (O-P) et (Q-R) autour du cœur du tétramère, se situe dans le domaine de fixation du cofacteur. Le passage de la structure de la « forme intermédiaire » à celle de la forme holo se fait via des mouvements définis du domaine du cofacteur par rapport au domaine catalytique et des changements d'angles dièdres de plusieurs résidus, qui ne seront pas détaillés.

Dans le domaine du cofacteur, le NAD s'enfonce dans la structure, impliquant une contraction du site de l'adénosine qui se déplace vers l'Asn313 d'environ 1,8 Å. Ce mouvement permet d'établir des interactions optimales dans le site de fixation du nicotinamide entre la Ser119 et l'atome NO2' du ribose, le pyridinium et la Tyr317, et le pyridinium et l'Ile11 dont la chaîne latérale change de conformation. Le carboxamide développe une liaison H intermoléculaire entre l'atome O7 et la chaîne latérale de l'Asn313 (N^{δ}) et une, intramoléculaire, entre l'atome N7 et l'un des oxygènes portés par l'atome PN du PPi. Ces deux interactions stabilisent le nicotinamide dans une conformation syn par rapport au ribose adjacent, conduisant à une stéréospécificité de type B.

Dans le site de fixation de l'adénosine, l'Asp32 et la boucle β_B-α_C (résidus 33, 34, 35) changent de conformation. Leurs mouvements comptent parmi les plus importants de ceux qui accompagnent la transition apo-holo. En conséquence, l'Asp32 n'engage plus de liaison H avec la Thr34 mais avec le NH peptidique de la Leu33. Les contacts hydrophobes sont également renforcés.

Le transfert de charge entre le NAD et le site actif.

La fixation du NAD sur la GAPDH provoque la formation d'une bande d'absorption (appelée bande de Racker) dont le maximum se situe autour de 360 nm (Racker et Krimsky, 1952). Elle disparaît lorsque l'enzyme est alkylée par l'acide iodoacétique ou acylée par le 1,3dPG (Harrigan et Trentham, 1973).

Kosower (1956) a suggéré l'existence d'un complexe par transfert de charge entre le NAD et un résidu du site actif de la GAPDH expliquant ce phénomène. L'étude de mutants des résidus du site actif Cys149 et His176 a montré que la Cys149 devait être impliquée dans l'apparition de cette bande d'absorption (Mougin *et al*, 1988).

Klepp *et al* (1989) ont de plus infirmé l'hypothèse selon laquelle la bande de Racker serait due à un équilibre entre le complexe non covalent GAPDH-NAD et un adduit entre l'atome C4N et

la Cys149. Par contre, la Cys149, stabilisée sous forme de thiolate par l'His176 (Skarzynski *et al*, 1987 ; Soukri *et al*, 1989, Talfournier *et al*, 1998), agirait en tant que donneur d'électrons et le pyridinium en tant qu'accepteur et favoriserait ainsi la fixation efficace du cofacteur.

V.1.1.3) Les sites de fixation des substrats.

Bien que le domaine catalytique subisse peu de modifications, la transition apo-holo entraîne une diminution de la distance entre les acides aminés catalytiques Cys149 et His176 d'environ 0,3 Å (de 3,96 +/- 0,11 Å à 3,63 +/- 0,08 Å).

La détermination de la structure tridimensionnelle de la GAPDH de *B. stearothermophilus* a permis de révéler deux densités de charge correspondant à deux molécules de sulfate (Skarzynski *et al*, 1987). Ces sites, appelés Ps et Pi, seraient respectivement responsables de la fixation du phosphate en C3 du D-G3P et du phosphate inorganique (figure 3 page 30a). Il est probable que dans la GAPDH de *B. stearothermophilus*, la position des ions sulfate n'indique pas les positions exactes des groupements phosphate durant l'acte catalytique comme cela a été suggéré pour la GAPDH de muscle de homard (Moras *et al*, 1975) et la GAPDH de *Thermotoga maritima* (Korndörfer *et al*, 1995).

Le site Ps est composé de l'Arg231 (qui engage 2 liaisons H avec l'O^3 du sulfate via ses groupements NH^1 et NH^2), de la Thr179 (liaison H entre l'O^3 du sulfate et l'OG^1 de la Thr179) et du groupement 2'OH du ribose adjacent au groupement nicotinamide du NAD (liaison H entre l'O^4 du sulfate et l'$O^{2'}$N du NAD). D'ailleurs la présence de ce ribose semble être indispensable à la formation de ce site car le taux d'occupation du site Ps par le sulfate est plus faible dans l'apostructure (Skarzynski et Wonacott, 1988).

Le site Pi est formé des chaînes latérales de la Ser 148, de la Thr208 ainsi que du NH peptidique de la Gly209. Des liaisons H sont également engagées avec plusieurs molécules d'eau, deux de ces molécules d'eau sont d'ailleurs liées à l'Arg195 permettant la création d'un relais d'interactions avec la charge positive de son groupement guanidinium.

L'attribution du rôle des deux sites de reconnaissance anionique n'a pas pu être déterminée de manière univoque à partir des structures cristallines connues, mais des études récentes de mutagenèse dirigée (Corbier *et al*, 1994 ; Michels *et al*, 1996) ont plutôt privilégié l'hypothèse de changement de site émise par Skarzynski (Skarzynski *et al*, 1987). Le groupement phosphate en C3 du D-G3P se fixerait dans le site Pi pour réaliser l'étape d'oxydo-réduction. Le changement conformationnel induit par le relargage du NADH et la réentrée d'une nouvelle molécule de NAD provoquerait alors sa migration vers le site Ps. Une molécule de phosphate inorganique pourrait alors se fixer dans le site Pi et réaliser l'attaque nucléophile sur le thioacylenzyme.

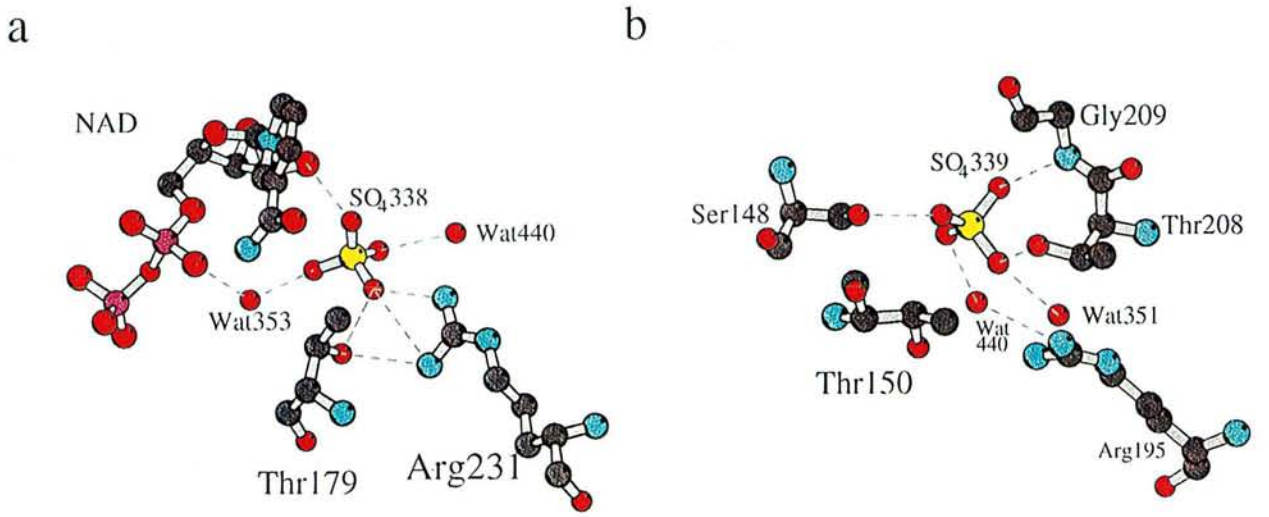


Figure 3 : Les sites de reconnaissance anionique de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Skarzynski *et al*, 1987).

a) Le site Ps, composé de l'Arg231, de la Thr179 et du groupement $OH^{2'}$ du ribose adjacent au groupement nicotinamide. La partie adénine du NAD n'est pas montrée pour des raisons de clarté de la figure.

b) Le site Pi, composé des résidus Ser148, Thr208, Gly209, Arg195 et Thr150.

Les atomes d'H ne sont pas représentés. Ces figures ont été réalisées à partir des données de la PDB avec les programmes RasMol (R.Sayle, RasMol : a program for visualisation of protein and nucleic acid structures, ftp://ftp.dcs.ed.ac.uk/pub/rasmol) et Molscript (Kraulis, 1991).

V.1.2) Organisation quaternaire.

V.1.2.1) Symétries.

L'analyse radiocristallographique de la GAPDH de *B. stearothermophilus* révèle une symétrie de groupe D2 (222) précise du tétramère sous forme holo (Skarzynski *et al*, 1987) et sous forme apo (Skarzynski et Wonacott, 1988).

La structure du tétramère est décrite dans un système de coordonnées d'axes *P*, *Q*, *R* défini par Rossmann pour la LDH (Rossmann *et al*, 1973) permettant des comparaisons aisées entre les structures quaternaires des diverses déshydrogénases (Lamzin *et al*, 1992) (figure 4 page 31 a).

V.1.2.2) Interfaces entre sous-unités.

L'interface P (entre les sous-unités O et P et entre les sous-unités R et Q) est la plus étendue (2400 $Å^2$) et la plus stable. Elle comprend 26 liaisons H dont 7 liaisons ioniques et de nombreux contacts hydrophobes auxquels s'ajoutent 20 liaisons H formées avec des molécules d'eau. Elle implique des résidus du feuillet β antiparallèle du domaine catalytique et de la boucle S, dont beaucoup sont conservés dans les différentes GAPDH. 118 résidus de chaque sous-unité participent à l'interface dont 59 résidus hydrophobes (50%), 26 résidus formant des liaisons H (22%) et 6 résidus glycine (5%) (Tableau 1 page 31b).

L'interface R (entre les sous-unités O et R et entre les sous-unités P et Q) est plus petite (1700 $Å^2$). Elle comprend 10 liaisons H et des contacts hydrophobes auxquels s'ajoutent 20 liaisons H formées avec des molécules d'eau. Elle implique des résidus de la boucle S, de l'hélice α_C et de la boucle suivante appartenant au site de liaison du NAD et le NAD lui même. 74 résidus de chaque sous-unité participent à l'interface dont 28 résidus hydrophobes (38%) et 2 résidus glycine (3%). La structure de la boucle S est bien définie en partie à cause des liaisons H intra sous-unité stabilisatrices entre les résidus Asp181 et Arg195 et les résidus Asp181 et His190.

L'interface Q (entre les sous-unités O et Q et entre les sous-unités P et R) est la plus petite (600 $Å^2$) et la moins stable avec seulement 6 liaisons H auxquelles s'ajoutent 5 liaisons H formées avec des molécules d'eau. Elle implique quelques résidus du domaine catalytique, des résidus de l'hélice α_C et de la boucle suivante. 33 résidus de chaque sous-unité participent à l'interface dont 8 résidus hydrophobes (24%) et 2 résidus glycine (6%) (Skarzynski *et al*, 1987; Duée *et al*, 1996).

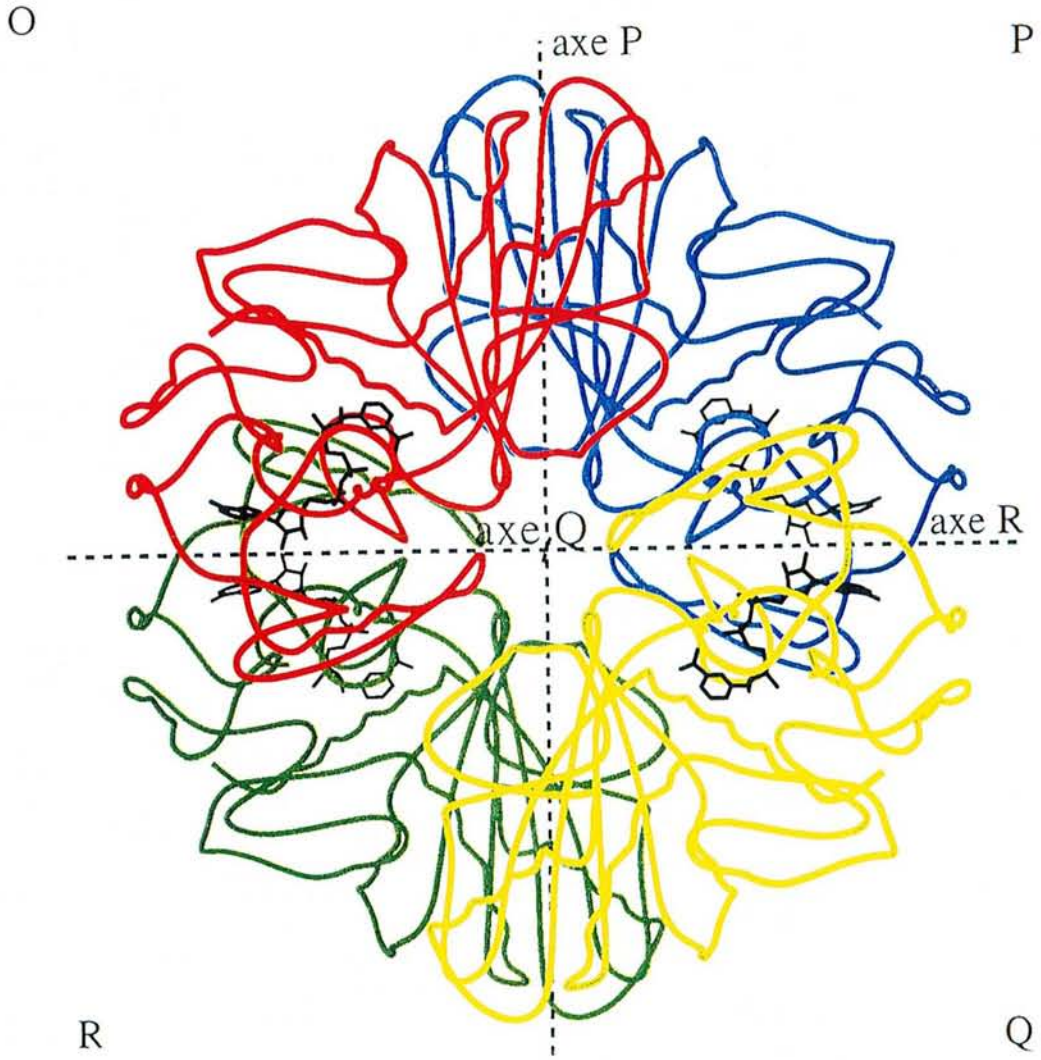


Figure 4 : Arrangement spatial des quatre sous-unités de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, sous forme holoenzyme (Skarzynski *et al*, 1987).
Seule la chaîne principale et les molécules de NAD (en noir) sont représentées. Chaque sous-unité est colorée suivant la convention définie par Rossmann *et al* (1973). Les lettres O, P, Q, et R indiquent chaque sous-unité et les axes *P*, *Q*, et *R* sont indiqués en lignes pointillées. Les sous-unités symétriques par rapport à l'axe *R* (O et R, P et Q) interagissent par l'intermédiaire du domaine de fixation du NAD et de la boucle S.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHEQUE

		Distance Å	
Interface *P*		O-P	Q-R
Arg 169 NH2	Glu245 OE1	2,74	3,12
Arg 169 NE	Glu 245 OE2	2,98	2,72
Thr 173 OG1	Asp 241 OD2	2,58	2,52
Thr 173 OG1	Lys 306 NZ	2,78	2,75
Arg 194 NH2	Asp 293 OD1	2,81	2,80
Arg 194 NH1	Leu 278 O	2,74	2,49
Arg 194 NH1	Asp 293 OD2	2,93	3,14
Arg 197 NH2	Asp 282 OD2	2,96	2,85
Arg 197 NH1	Asp 282 OD1	2,66	2,65
Glu 201 OE1	Arg 281 NH2	2,84	-†
Glu 201 O	Arg 281 NE	2,96	-†
Ser 202 OG	Arg 281 N	3,19	3,12
Ile 203 N	Ser 280 OG	2,86	3,05
Asp 241 OD2	Thr 173 OG1	2,63	2,76
Glu 245 OE2	Arg 169 NE	2,79	2,79
Glu 245 OE1	Arg 169 NH2	2,66	2,88
Leu 278 O	Arg 194 NH1	2,84	2,71
Ser 280 OG	Ile 202 N	3,02	2,77
Arg 281 N	Ser 202 OG	3,11	3,29
Arg 281 NH2	Glu 201 OE1	-	2,97†
Arg 281 NE	Glu 201 O	-	2,85†
Asp 282 OD2	Arg 197 NH2	2,74	2,65
Asp 282 OD1	Arg 197 NH1	2,70	2,61
Asp 293 OD2	Arg 194 NH1	2,94	2,86
Asp 293 OD1	Arg 194 NH2	2,79	2,73
Lys 306 NZ	Thr 173 OG1	2,83	3,00
Interface *R*		O-R	P-Q
Arg 13 NH2	Asp 186 O	2,84	2,90
Ser 48 N	Asp 186 OD2	3,03	3,04
Ser 48 OG	Asp 186 OD1	2,72	2,79
Asn 180 ND2	Leu 185 O	2,93	3,05
Asn 180 OD1	Leu 185 N	3,01	3,02
Leu 185 N	Asn 180 OD1	3,09	2,97
Leu 185 O	Asn 180 ND2	3,18	2,87
Asp 186 OD2	Ser 48 N	2,86	2,98
Asp 186 OD1	Ser 48 OG	2,66	2,72
Asp 186 O	Arg 13 NH2	2,99	2,77
Interface *Q*		O-Q	P-R
Arg 52 NH2	Asp 282 O	3,15	3,09
Arg 52 NE	Asp 282 O	3,20	3,14
Glu 276 OE2	Tyr 46 OH	2,85	2,80§
Tyr 46 OH	Glu 276 OE2	3,04	3,05
Asp 282 O	Arg 52 NH2	2,79	3,05
Asp 282 O	Arg 52 NE	2,90	2,84

† Arg 281 asymétrique
§ Densité électronique faible pour le Glu 276(O)

Tableau 1 :
Liaisons hydrogène inter sous-unités de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.
D'après Skarzynski *et al*, 1987.

BIBLIOTHÈQUE

V.1.2.3) Coopérativité de fixation du NAD.

V.1.2.3.1) Généralités.

La fixation du NAD aux quatre sous-unités de la GAPDH présente une coopérativité positive ou négative selon la source de l'enzyme. Les GAPDH de muscle de lapin (Conway et Koshland, 1968 ; Boers *et al*, 1971), de muscle d'esturgeon (Seydoux *et al*, 1973 ; Kelemen *et al*, 1975), de muscle de homard (DeVijlder *et al*, 1968), de *B. stearothermophilus* (Allen et Harris, 1975) et d'*E. coli* (Corbier *et al*, 1990b) fixent le NAD avec une affinité décroissante. La GAPDH de levure présente vis-à-vis du NAD une coopérativité positive (Kirschner, 1971 ; Kirschner *et al*, 1971) ou négative (Cook et Koshland, 1970) selon les conditions de pH et de température.

Différents modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier modèle permet seulement d'expliquer la coopérativité positive alors que les deux suivants permettent d'expliquer à la fois la coopérativité positive et la coopérativité négative.

Le modèle "de symétrie concertée", ou "MWC" (Monod *et al*, 1965) postule qu'à l'état non lié, l'enzyme peut exister sous 2 formes R et T qui sont en équilibre thermodynamique. Dans chacune de ces deux formes, les sites de fixation du ligand sont équivalents et indépendants, une fixation michaelienne est alors observée. La forme R se distingue de la forme T par sa plus grande affinité pour le ligand, qui va donc se fixer préférentiellement sur la forme R et entrainer une diminution de la concentration en R_0 (R_0 étant la forme qui n'a pas fixé de ligand). Cette diminution de la concentration en R_0 entraîne un déplacement de l'équilibre vers la formation de R, conduisant à la coopérativité positive observée.

Des études en cinétique rapide et par saut de température réalisées par Kirschner (1971) et Kirschner *et al.* (1971) semblent indiquer que la coopérativité positive de la GAPDH de levure à 40°C obéit à ce modèle.

Le modèle de la fixation séquentielle, ou "asymétrie induite", ou encore "KNF" qui a été introduit par Koshland *et al.* (1966), permet d'expliquer la coopérativité positive et négative. Ce modèle, comme le précédent, suppose une symétrie complète des états apo et holo de la protéine. La fixation d'un ligand sur une sous-unité induirait un changement conformationnel de la sous-unité adjacente, pour laquelle la deuxième molécule de ligand aura moins d'affinité (coopérativité négative) ou plus d'affinité (coopérativité positive) et ainsi de suite jusqu'à occupation de tous les sites. Les états intermédiaires ne sont donc pas symétriques, l'asymétrie étant induite par le ligand. De nombreuses données à l'équilibre sur diverses GAPDH sont en faveur de ce modèle (Conway et Koshland, 1968 ; Henis et Levitski, 1980 ; Branlant *et al*, 1983a ; Wilder *et al*, 1989).

Le modèle proposé par Seydoux, Malhotra et Bernhard, ou « SMB » (Malhotra et Bernhard, 1968, 1973 ; Seydoux *et al*, 1974) suppose une asymétrie préexistante de la molécule, causée par des interactions différentes entre les sous-unités. L'enzyme se comporterait comme un dimère de dimères ayant au maximum un axe de symétrie, et donc seulement deux types de sites, comme le suggère la structure cristallographique obtenue sur la GAPDH de muscle de homard (Moras *et al*, 1975). Certaines expériences, réalisées en solution, ont effectivement été interprétées par des modèles impliquant seulement deux types de sites (Seydoux *et al*, 1973 ; Kelemen *et al*, 1975; Malhotra *et al*, 1992). Cependant, l'étude par RMN de la liaison du [4-^{13}C] NAD à la GAPDH de muscle d'esturgeon a montré que ce modèle n'était pas incompatible avec le modèle de l'asymétrie induite. Ce mécanisme implique l'existence de deux états conformationnels E-NAD et E'-NAD en équilibre, l'état E' des deux premiers sites étant stabilisé par la liaison du NAD aux troisième et quatrième sites, qui deviendraient ainsi moins affines pour le NAD (Klepp *et al*, 1989).

Il est important que les résultats déduits des structures cristallographiques soient confirmés par des informations structurales obtenues à partir d'études réalisées en solution. En effet, l'empilement régulier des cristaux peut influencer la conformation de la protéine alors qu'en solution, la protéine posséde une plus grande liberté conformationnelle et peut dans certains cas adopter plusieurs conformations stables (Frauenfelder *et al*, 1991; Silva et Weber, 1993; Cioni et Strambini, 1994; Duée *et al*, 1996).

L'eau joue un rôle important dans la transition allostérique. D'après des travaux récents, le degré d'hydratation des macromolécules ainsi que la localisation des molécules d'eau qui leur sont associées, changent au cours des transitions allostériques qui font partie de leur activité métabolique normale. C'est le cas, par exemple du cytochrome P450 (Poulos *et al*, 1987) et de l'hémoglobine (Colombo *et al*, 1992). Un changement de l'architecture locale de l'eau et donc des concentrations ioniques se répercuterait sur le fonctionnement et la structure des macromolécules. Wiggins va plus loin (Wiggins et MacClement, 1987 ; Wiggins et Van Ryn, 1987 ; Wiggins, 1990) en insistant sur l'importance des changements d'état de l'eau parce qu'ils s'accompagnent de changements de densité, donc de volume. Ils peuvent donc entraîner des effets mécaniques. Ainsi, une des clés des changements allostériques, générateurs de mouvements ou de variations des propriétés chimiques, pourrait être précisément l'exploitation des changements d'états de l'eau.

V.1.2.3.2) Cas de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

Les données à l'équilibre obtenues pour la GAPDH de *B. stearothermophilus* sont en faveur du modèle de la fixation séquentielle ou "asymétrie induite" (Clermont *et al*, 1993).

De plus, la symétrie 222 parfaite des structures déterminées à haute résolution de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous forme apo et holo satisfait à ces hypothèses. Leslie et Wonacott (1984) ont en outre montré, sur une structure à résolution moyenne, que la liaison d'une seule molécule de NAD au tétramère provoquait le passage de la sous-unité ayant lié le NAD d'une structure apo à une structure très similaire à l'holoenzyme, les autres sous-unités conservant une structure très proche de l'apoenzyme. Cela suggére fortement que la fixation du NAD induit une transition conformationnelle. Ces résultats et ceux obtenus par l'étude des propriétés de luminescence des résidus Trp84 et Trp310 de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Gabellieri *et al*, 1996) sont en faveur de ce modèle.

Mais ces résultats ne révèlent pas la nature des interactions inter sous-unités responsables de la diminution progressive de l'affinité des sites pour le NAD. Sur la base de la proximité spatiale des sites de fixation du NAD situés de part et d'autre de l'axe *R*, il a été suggéré que c'est l'axe *R* qui était impliqué dans les interactions inter sous-unités qui conduisent à la coopérativité négative (Biesecker *et al*, 1977). Des études de résonance paramagnétique électronique ne vérifient pas cette suggestion (Beth *et al*, 1984). La proposition, formulée à partir de la structure cristallographique à résolution moyenne par Biesecker *et al* (1977), selon laquelle la boucle S est une partie flexible de la structure qui permettrait de transmettre les changements structuraux d'une sous-unité à une autre a pu être exclue. En effet, dans les deux formes apo et holoenzyme, la boucle S adopte une conformation très similaire (Skarzynski *et al*, 1987). De plus, le mutant N313T de la GAPDH d'*E. coli*, qui possède une boucle S déstabilisée et mobile n'apparaissant pas dans les cartes de densité électronique, présente les mêmes propriétés de coopérativité que l'enzyme sauvage. Cela suggère fortement que la boucle S ne doit pas intervenir dans le mécanisme de coopérativité (Corbier *et al*, 1990b; Duée *et al*, 1996). La superposition des structures des formes apo et holoenzyme met en évidence une rotation autour de l'axe *P*, ce qui pourrait conduire le brin externe du feuillet β du domaine catalytique d'une sous-unité à transmettre la rotation au brin externe du feuillet β du domaine catalytique de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *P* (Duée *et al*, 1996). Ceci suggère que l'interface P pourrait être essentielle à la transmission du message de coopérativité.

La coopérativité de fixation du NAD sur l'enzyme de *B. stearothermophilus*, étudiée par extinction de fluorescence de la protéine, a été interprétée selon le modèle de "l'asymétrie induite" tantôt avec 2 classes de sites de fixation (Allen et Harris, 1975) tantôt avec 4 classes de sites de fixation (Clermont *et al*, 1993).

Il a été montré que le noyau pyridinium du NAD est indispensable pour induire le changement conformationnel apo-holo (Biesecker *et al*, 1977), la fixation d'AMP ou d'ATP sur des

cristaux d'apoenzyme de *B. stearothermophilus* n'altérant pas ces cristaux alors que la fixation du NAD les fait craquer. Il a aussi été montré qu'une absence de stabilisation efficace de la partie nicotinamide du NAD devenue très mobile (avec un facteur d'agitation thermique élevé), se traduit par une diminution de l'intensité de la bande d'absorption du complexe binaire enzyme-NAD, mais n'empêche pas la coopérativité de fixation du NAD (Corbier *et al*, 1990b; Duée *et al*, 1996).

Le rôle de l'Asp32 dans la coopérativité de fixation a déjà été mis en évidence par des expériences de mutagenèse dirigée (Clermont *et al*, 1993). L'Asp32 et le reste du sous-site de fixation de l'adénosine joueraient un rôle important dans la révélation de la coopérativité en permettant un positionnement correct de la partie nicotinamide du NAD (Schlessinger et Levitski, 1974; Schlessinger *et al*, 1975; Henis et Levitski, 1977, 1980; Glöggler *et al*, 1982).

V.2) Mécanisme enzymatique.

V.2.1) Résidus catalytiques.

Deux acides aminés sont directement impliqués dans la catalyse : la Cys149 et l'His176.
La Cys149, résidu hyperconservé chez toutes les GAPDH et situé dans la partie N-terminale de l'hélice α_1, permet la formation des intermédiaires hémithioacétal et thioacyle alors que l'His176, localisée dans la partie C-terminale du feuillet β_1, est supposée jouer trois rôles dans le mécanisme réactionnel (Soukri *et al*, 1989) en tant que:

- catalyseur acide-base.
- stabilisateur des intermédiaires tétraédriques et thioacyle formés tout au long du processus catalytique.
- activateur de la nucléophilie de la Cys149 à pH neutre.

Dans les conditions physiologiques, le rôle majeur du résidu His176 n'est pas d'activer la nucléophilie de la Cys149 via la formation d'une paire d'ions Cys^-149/His^+176 mais d'abord de faciliter le transfert d'hydrure (Talfournier *et al*, 1998).

V.2.2) Mécanisme enzymatique.

Le mécanisme réactionnel de la GAPDH a été étudié par de nombreux auteurs sur la base d'études cinétiques. Leurs études ont cependant mené à des conclusions différentes et controversées. Ainsi Furfine et Velick (1965) ont conclu à un mécanisme d'association au hasard Ter-Bi pour la GAPDH isolée de muscle de lapin. Keleti (1964) a montré pour la GAPDH de porc que l'association du G3P et du NAD était aléatoire et que l'étape limitante du mécanisme était l'association du Pi comme troisième substrat. 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.

Orsi et Cleland (1972) ont proposé un mécanisme réactionnel Ter-Bi qu'ils ont conforté sur la base d'études d'effets isotopiques (Canellas et Cleland, 1991).

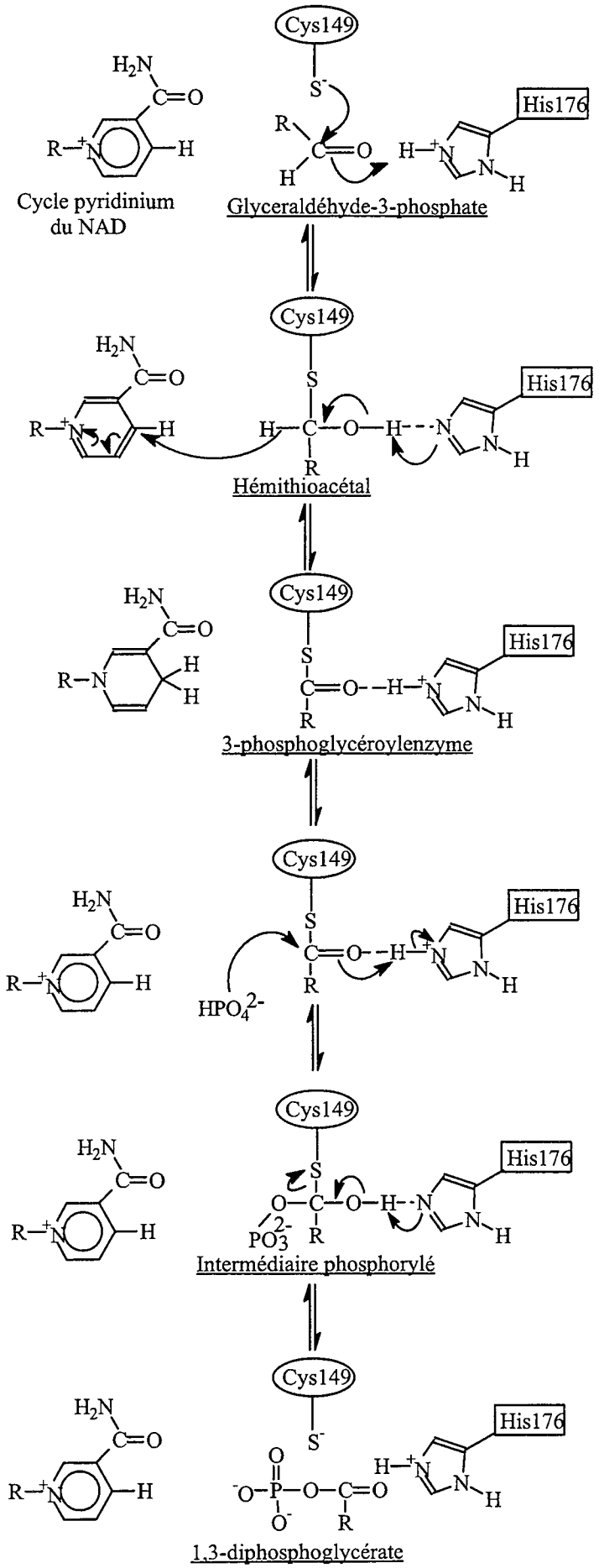
Néanmoins, Liu et Huskey (1992) ont réfuté ce mécanisme et soutiennent le mécanisme ping-pong (double déplacement) proposé par Segal et Boyer (1953). Ce mécanisme, initialement proposé, avait été conforté et affiné par des études cinétiques (Trentham, 1971a, 1971b ; Harrigan et Trentham, 1974 ; Duggleby et Dennis, 1974a, 1974b ; Meunier et Dalziel, 1978). C'est ce mécanisme qui est le plus couramment accepté de nos jours (figure 5 page 36a) bien que le mécanisme proposé par Orsi et Cleland (1972) n'ait pu être totalement réfuté.

Formation de l'intermédiaire hémithioacétal.

L'intermédiaire hémithioacétal est formé suite à une attaque nucléophile du groupement thiolate de la Cys149 sur le carbone aldéhydique du G3P (sp^2). L'état de transition tétraédrique nécessaire à la formation de l'hémithioacétal serait stabilisé par le groupement imidazole de l'His176 et le groupement nicotinamide du NAD. L'existence de cet intermédiaire ne peut pas être prouvée, de par son caractère chimique instable, mais l'étude de Armstrong et Trentham (1976) va dans le sens de son existence.

Formation du thioacylenzyme.

Cette étape conduit, via un transfert d'hydrure du C_1 de l'intermédiaire thiohémiacétal vers le C_4 du nicotinamide, à la formation de l'intermédiare thioacylenzyme et du cofacteur réduit. Le transfert d'hydrure est facilité par l'His176 jouant alors le rôle de base (Talfournier *et al*, 1998). Le thioacylenzyme a pu être isolé à partir de la GAPDH de muscle de lapin (Bloch *et al*, 1971). Il



La Cys 149, dont la réactivité est augmentée par le biais d'une paire d'ions avec l'His 176 protonée, attaque le centre électrophile du G3P.
La formation de l'hémithioacétal est assistée par l'His 176 protonée jouant le rôle d'acide.
(R = $CHOH-CH_2OPO_3^{2-}$)

L'hémithioacétal est stabilisé par liaison H avec l'His 176 protonée.
L'His 176 jouant le rôle base assiste la réaction d'oxydoréduction, i.e. le transfert d'hydrure de l'hémithioacétal au pyridinium qui est ainsi réduit de NAD^+ à NADH.

L'acylenzyme est stabilisé par liaison H avec l'His 176 protonée.

L'étape d'isomérisation de l'acylenzyme se fait après le remplacement du NADH par un NAD^+.
L'attaque nucléophile d'un phosphate (phosphorolyse) est assistée par l'His 176 protonée jouant le rôle d'acide.

Le relargage du 1,3-dPG est assisté par l'His 176 jouant le rôle de base.

L'enzyme se retrouve sous forme holoenzyme.

Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme réactionnel proposé pour la GAPDH phosphorylante de *B. stearothermophilus* (d'après Segal et Boyer, 1953).

serait stabilisé par une liaison H entre l'oxygène en C_1 de l'acylenzyme et le groupement NH^{ε} de l'His176 protonée. Le cofacteur réduit se dissocierait ensuite du complexe ternaire et une nouvelle molécule de cofacteur oxydé viendrait s'y fixer, cette étape de remplacement entraînerait des changements conformationnels importants. Il est à rappeler que cette dernière étape reste sujette à controverse.

Etude de la phosphorolyse.

Dans les conditions physiologiques, le groupement acyle est transféré sur un groupement accepteur phosphate : l'ion HPO_4^{2-} (Armstrong et Trentham, 1976). L'attaque nucléophile du Pi 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 H entre son OH en C_1 et l'imidazole non protoné de l'His176.

La vitesse du transfert d'acyl est fortement accélérée par la présence du NAD qui, par le biais de sa charge positive, favoriserait l'attaque nucléophile du phosphate dianionique facilitant ainsi la formation de l'ester phosphorique (Trentham, 1968 ; Biesecker *et al*, 1977). Le relargage du produit (1,3dPG) serait accompagné du relargage d'un proton (Harrigan et Trentham, 1973), conduisant à la libération de l'enzyme sous sa forme active (holoenzyme).

Etapes limitantes de la réaction

Les études initiales de Trentham (1971a, 1971b), puis de Corbier *et al.* (1992, 1994), et de Liu et Huskey (1992) suggèrent que les étapes limitantes de la réaction seraient :

- dans le sens phosphorylation oxydative : la phosphorolyse à pH acide et une étape associée au relargage du NADH à pH basique.
- dans le sens déphosphorylation réductive : le relargage du G3P à pH acide et un changement conformationnel lié à la fixation du NADH à pH basique.

VI) Objectifs.

L'objectif de ce travail était de déterminer si la structure quaternaire de la GAPDH de *B. stearothermophilus* était indispensable à la révélation de l'activité enzymatique et d'identifier les facteurs structuraux responsables des propriétés de coopérativité observée lors de la fixation du cofacteur NAD.

Pour aborder cette problématique, nous avons utilisé comme support la GAPDH de *B. stearothermophilus* pour les raisons suivantes :

- elle est fortement surproduite dans *E. coli* et est aisément purifiée. Cela a été rendu possible par le clonage et le séquençage du gène codant la GAPDH de *B. stearothermophilus*. (Branlant *et al*, 1983b ; Branlant et Branlant, 1985 ; Branlant *et al*, 1989).
- elle est très bien caractérisée au niveau de la spécificité de cofacteur (Corbier *et al*, 1990a ; Clermont *et al*, 1993), des sites de fixation anionique (Corbier *et al*, 1994 ; Michels *et al*, 1996) et de l'implication de différents résidus dans l'efficacité enzymatique (Talfournier *et al*, 1998).
- la structure cristallographique des formes apo et holoenzyme est connue à haute résolution (Skarzynski *et al*, 1987 ; Skarzynski et Wonacott, 1988 ; Duée *et al*, 1996).

Le but de notre étude était :

- de générer des dimères de type O-P (où les sous-unités sont symétriques par rapport à l'axe *P*) grâce à la connaissance de la structure tridimensionnelle de la GAPDH de *B. stearothermophilus* et à l'outil modélisation moléculaire, qui permettent de prévoir les mutations déstabilisatrices à effectuer au niveau des interfaces du tétramère.
- de caractériser les propriétés enzymatiques des GAPDH mutées générées, les relier à leur état oligomérique et les comparer à celles de l'enzyme de type sauvage afin de déterminer le rôle de la structure quaternaire dans la révélation de l'activité enzymatique.
- de caractériser les propriétés de coopérativité de fixation du NAD des GAPDH mutées générées, et les relier à leur état oligomérique afin d'essayer de déterminer le rôle de chaque interface dans le phénomène de coopérativité observée lors de la fixation du NAD.
- d'étudier l'équilibre existant entre la forme dimérique et la forme tétramérique de mutants définis, en l'occurrence (N180G-E276G) et Y283V.

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

MATERIEL ET METHODES

S.C.D. U.H.P. NANCY I SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

I) Matériel biologique.

I.1) Plasmides et phages.

pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) : Plasmide de 4,3 kilobases (kb) dérivé du plasmide colE1 et portant les gènes de résistance à l'ampicilline (Amp) et à la tétracycline (Tet). Il est utilisé pour le sous-clonage et l'expression des gènes sauvages et mutés de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

B1b (Branlant *et al.*, 1989) (figure 6 page 39a) : Plasmide recombinant pBR322, contenant le gène (partie codante plus promoteur) de la GAPDH de *B. stearothermophilus* et portant une résistance à l'Amp.

pBluescript II SK$^+$ (pSK$^+$) : Phagemide de 3 kb contenant un fragment du gène de la β-galactosidase d'*E. coli* qui permet la complémentation des souches portant *lacZ*ΔM15. Il porte également le gène de résistance à l'Amp et l'origine de réplication f1 du phage M13. Il peut de ce fait être isolé sous forme simple brin (sb) à condition de coinfecter avec un phage "helper".

pSKBstII (Talfournier *et al*, 1998) (figure 6 page 39a) : Plasmide recombinant construit à partir de pSK$^+$ et contenant un fragment de 2,9 kb portant le gène sauvage de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous le contrôle du promoteur *lac* de la β-galactosidase d'*E. coli*. Ce plasmide est utilisé à la fois pour la mutagenèse dirigée et pour la production de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

I.2) Souches bactériennes.

I.2.1) Souches utilisées pour les préparations plasmidiques et la mutagenèse dirigée.

E. coli **TG1** : F' [*traD*36, *proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15], *supE*, *hsd*Δ5, *thi*, Δ(*lac-proAB*). Elle ne peut ni modifier, ni hydrolyser l'ADN transfecté. Elle est utilisée pour les transformations plasmidiques.

E. coli **HB2154** : *ara*Δ(*lac*, *pro*), *thi*, F' : *proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15, *mutL*::Tn10. Cette souche est mutée dans un gène majeur du système de réparation (gène *mutL*) par insertion d'un transposon Tn10 et ne possède pas d'ARNt suppresseurs (Carter *et al*, 1985).

E. coli **CJ236** : *dut*1, *ung*1, *thi*-1, *relA*1/pCJ105(cam^r) F'. Elle est mutée dans la voie métabolique des bases pyrimidiques et accumule l'uracile. Elle est utilisée pour la préparation du pSKBstII sb riche en uracile pour la mutagenèse.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

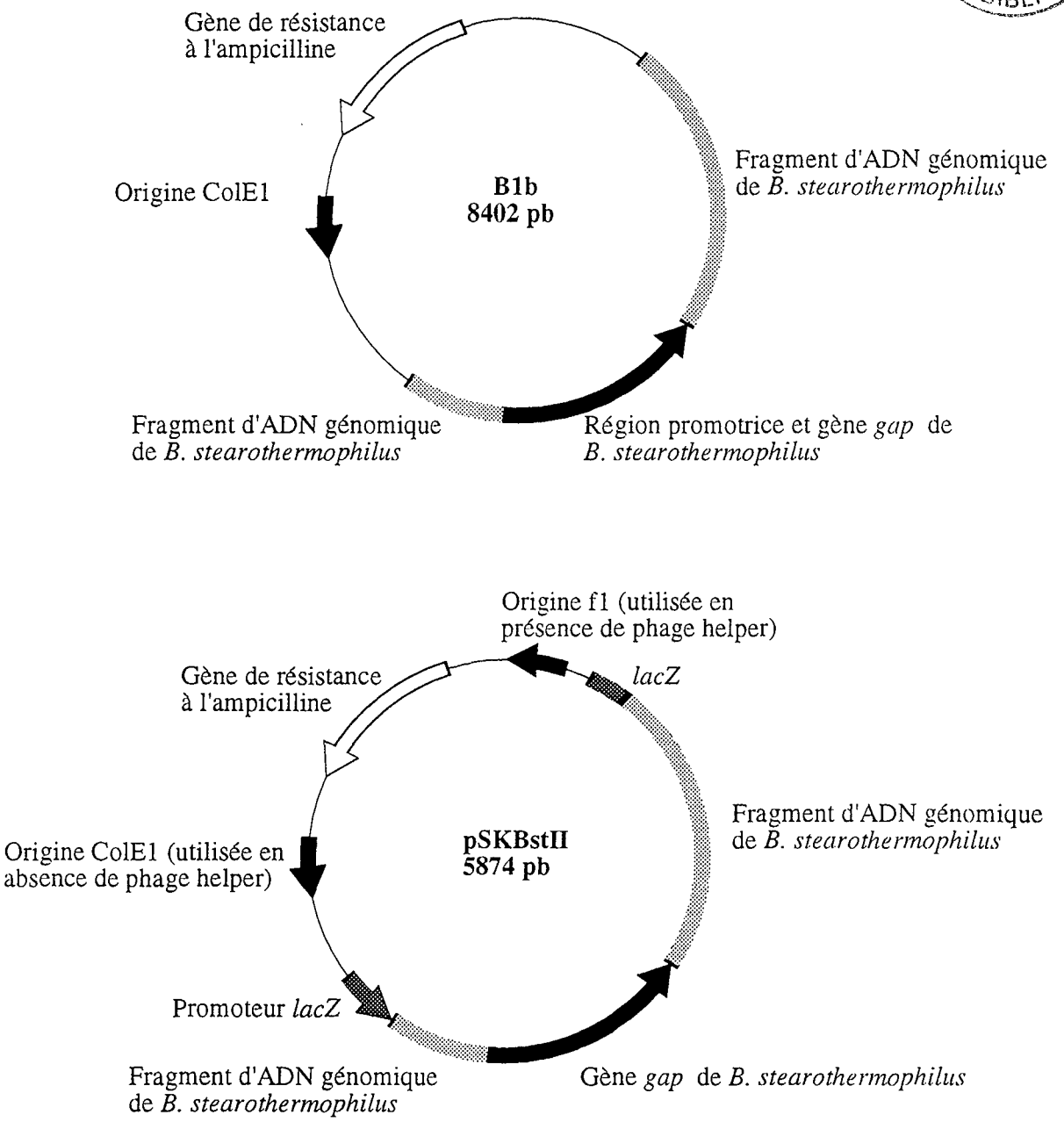


Figure 6 : Représentation schématique des plasmides B1b et pSKBstII.

I.2.2) Souches utilisées pour la production de la GAPDH.

E. coli **XL1-blue** : *supE*44, *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*46, *thi*, *relA*1, *lac*$^-$, F'[*proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15, Tn10 (tet^R)]. Cette souche a été utilisée lors des premiers essais d'expression et de production en erlenmeyers des GAPDH sauvages et mutées de *B. stearothermophilus.*

E. coli **HB101** : *SupE*-44, *hsd*S20 (r_B^-, m_B^-), *recA*13, *ara*14, *proA*2, *lacY*1, *galK*2, *rps*L20, *xyl*-5, *mtl*-1, , λ. Elle présente un phénotype RecA$^-$ et donc minimise les processus de recombinaison. Elle a été utilisée pour l'expression et la production en erlenmeyers des GAPDH sauvage et mutées de *B. stearothermophilus.*

E. coli **DH5α** : *supE*44 Δ*lac*U169 (*Φ*80 *lacZ*ΔM15) *hsd*R17 *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *rel*A1. Cette souche est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique mais également pour l'expression et la production en erlenmeyers des GAPDH sauvage et mutées de *B. stearothermophilus.*

I.3) Milieux de culture

Milieu riche LB :

Bactopeptone	10g/l
Extrait de levure	5g/l
NaCl	5g/l

pH ajusté à 7,5 par NaOH 10N, autoclavé pendant 50 min à 1 bar

Milieu minimum M63 2x :

KH_2PO_4	200 mM
$(NH_4)_2SO_4$	30 mM
$MnSO_4$, 7 H_2O	1,6 mM
$FeSO_4$, 7 H_2O	4 mM

pH ajusté à 7,0 par KOH 10N, autoclavé pendant 30 min à 1 bar

M63 succinate-glycérol :

M63 2x	500 ml
tryptophane/méthionine 0,125%	20 ml
thiamine 0,2%	0,5 ml
casaminoacides 2,5%	40 ml
succinate 20%/ glycérol 4,5%	20 ml
H_2O	quantité suffisante pour (qsp) 1l

Milieu SOC (glucose) :

Bactotryptone	2% (p/v)
Extrait de levure	0,5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
$MgCl_2$	10 mM
$MgSO_4$	10 mM
glucose	20 mM

Pour les milieux solides, on ajoute 15g de bacto-agar par litre de milieu.

En cas de sélection par les antibiotiques, on ajoute les concentrations suivantes :

Amp:	100 mg/l
Tet:	20 mg/l
Cm:	25 mg/l

II) Techniques de génie génétique.

II.1) Transformation des bactéries compétentes.

II.1.1) Technique classique (Maniatis *et al*, 1989).

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* CJ236, DH5α, HB101, HB2154, TG1, XL1-blue.

Une culture de cellules ensemencée au 1/50ème est arrêtée en phase exponentielle lorsque la DO à 600 nm (DO_{600}) atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de $CaCl_2$ 50 mM qui fragilise les parois des bactéries. Après 30 min dans la glace, les cellules sont à nouveau centrifugées et le culot est repris dans 1/10ème du volume initial de solution de $CaCl_2$ 50 mM. Les cellules sont compétentes 3 heures après leur préparation et peuvent être conservées 2 jours à +4°C, ou plusieurs mois en glycérol 15% après congélation rapide de fractions aliquotes dans l'azote liquide et stockage à -80°C.

150 µl de cellules compétentes et 50 ng d'ADN sont incubés 30 min dans la glace, puis soumis à un choc thermique de 30 secondes à 42 °C puis placés 5 min dans la glace. Les cellules sont immédiatement étalées sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique de sélection adapté et incubées à 37°C.

II.1.2) Bactéries supercompétentes (Inoue *et al.*, 1990).

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5α, HB101, TG1.
Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB (milieu SOC sans glucose) à une température comprise entre 18 et 20°C, sous une forte agitation. Cette culture est arrêtée en phase exponentielle lorsque la $DO_{600_{nm}}$ atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TB (PIPES 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, $MnCl_2$ 55 mM, pH 6,7) froid. Après une incubation de 10 minutes dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 1/10ème du volume initial de solution de TB en présence de DMSO 7% final. Les fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans l'azote liquide et stockées à –80°C.

50 µl de cellules supercompétentes et de 0,1 à 2 ng d'ADN sont incubés 30 min dans la glace, puis soumis à un choc thermique de 30 secondes à 42 °C puis placés 5 min dans la glace. Les cellules sont régénérées en milieu SOC pendant 30 min sous agitation à 37°C avant d'être étalées sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique de sélection adapté et incubées à 37°C.

II.2) Préparation de l'ADN.

(Maniatis *et al.*, 1989)

II.2.1) ADN double brin (db).

II.2.1.1) La technique du lysat clair.

Cette technique est utilisée pour la préparation en grande quantité d'ADN plasmidique à partir d'une culture de 250 ml pendant une nuit en milieu LB de bactéries transformées par le plasmide à préparer.

Les cellules, récupérées par centrifugation, sont lavées dans du tampon A (saccharose 25%, N-tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris)-HCl 50mM, pH 7,5) puis lysées par une solution contenant du lysozyme et du Triton X100. Après centrifugation pour enlever les débris cellulaires, les acides nucléiques solubles sont précipités par une solution de polyéthylène glycol (PEG)/ NaCl puis l'ADN plasmidique est purifié par ultracentrifugation à l'équilibre, en gradient de chlorure de césium. La purification est achevée par un traitement à la protéinase K et à la ribonucléase A et l'ADN plasmidique est concentré par précipitation à l'alcool.

La concentration de l'ADN ainsi obtenu est mesurée par absorption dans l'ultraviolet en admettant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN db. La pureté de l'ADN est estimée à partir du rapport DO_{260}/DO_{280} qui doit être compris entre 1,8 et 2.

II.2.1.2) La minipréparation.

La minipréparation d'ADN est une technique utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN (à partir de 2 à 5 ml de culture) dans un but d'analyse et de criblage.

Comme dans la technique du lysat clair, les cellules sont lysées par une solution contenant du lysozyme, puis l'ADN est dénaturé par de la soude. Après centrifugation, l'ADN plasmidique soluble est extrait par du phénol seul, puis par un mélange de phénol/chloroforme et précipité à l'alcool. Le culot ainsi obtenu est traité par la ribonucléase A et l'ADN plasmidique est précipité par un mélange de PEG/NaCl.

II.2.2) ADN simple brin (sb).

De l'ADN sb est utilisé comme matériel de départ pour la mutagenèse dirigée par la méthode de Kunkel. Dans notre cas, le sb est préparé à partir du plasmide pSKBstII, dérivé du phage M13.

Le phage M13 est un phage filamenteux qui ne lyse pas les cellules qu'il infecte, mais ralentit leur croissance deux à trois fois. Dans les cellules infectées, il se réplique sous forme db mais c'est seulement le brin (+) qui est excrété dans le milieu et encapsidé. Pour disposer de la forme sb, il faut donc purifier le surnageant de culture.

500 µl d'une préculture de cellules *E. coli* CJ236 contenant le plasmide servent à ensemencer 15 ml de milieu LB/Amp/Cm. Etant donné que le plasmide pSKBstII ne possède pas l'information pour encapsider le phage, il est nécessaire d'ajouter à la culture en phase exponentielle du phage helper M13K07 puis de laisser incuber sous agitation pendant une nuit. Le surnageant récolté est traité par 0,4 volume d'une solution de PEG 20%/NaCl 2,5 M. Après centrifugation, le culot de phages est repris dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 1mM, pH 8) et les protéines sont éliminées par 3 extractions phénoliques, 4 extractions avec un mélange phénol-chloroforme et deux extractions au chloroforme seul. L'ADN sb, précipité à l'alcool, présente alors un rapport DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,6 et 1,8.

II.3) Analyse de l'ADN.

II.3.1) Amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR, pour polymerase chain reaction).

Afin de vérifier la présence du gène entier de la GAPDH sur le plasmide après mutagenèse, la portion d'ADN comprise entre deux oligonucléotides fixés de part et d'autre du gène dans le plasmide est amplifiée, et sa taille est vérifiée par migration sur un gel d'agarose.

L'amplification est réalisée directement sur les cellules d'une colonie de mutagenèse, déposées dans un microtube et auxquelles on ajoute un mélange de 2'-désoxynucléotides triphosphate (dNTP) et une polymérase ADN-dépendante thermostable:

oligodésoxynucléotide 1	100 ng
oligodésoxynucléotide 2	100 ng
tampon PCR 10x	5 µl
dNTP (1,25 mM de chaque)	8 µl
Taq polymérase (Boehringer)	2 unités
H_2O	qsp 50 µl

La réaction est effectuée sur un appareil Perkin-Elmer par répétition d'un cycle comprenant une étape de dénaturation (1,5 min à 94 °C), une étape d'hybridation (2 min à 55 °C) et une étape d'élongation (3 min à 72 °C).

10 µl du produit issu de la réaction de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) en présence d'un marqueur de taille.

II.3.2) Digestion par les enzymes de restriction.

Les hydrolyses sont réalisées à 37 °C pendant 1,5 h. La quantité d'enzyme est de 3 unités par µg de matériel nucléique. Les enzymes sont fournies par Boehringer ou Biolabs et les tampons préconisés par les fournisseurs sont utilisés. Dans tous les cas, la concentration en ADN est de 1 µg / 10 µl de mélange d'hydrolyse.

Les fragments d'ADN sont ensuite séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (p/v).

II.3.3) Séquençage de l'ADN db.

Le gène de la GAPDH est séquencé après mutagenèse, en utilisant l'ADN polymérase du bactériophage T7, afin de vérifier la présence de la mutation recherchée et d'exclure la présence de mutations supplémentaires (Tabor et Richardson, 1987) .

1re étape : Dénaturation de l'ADN db circulaire

ADN plasmidique db	0,5 pmole
NaOH 2,5 N	2 µl
H_2O	qsp 20 µl

Le mélange est incubé 5 min à température ambiante

2e étape : Hybridation de l'amorce nucléotidique

Oligonucléotide	6 pmoles
NaAc 3M, pH 4,6	4 µl
Ethanol	75 µl

Le mélange est incubé 10 min à -80 °C, puis centrifugé 15 min à 16000g

Le culot est repris dans:

H_2O	8 µl
Tampon 5x	2 µl

(Tris-HCl 200mM pH 7,5, $MgCl_2$ 50 mM, NaCl 250 mM)

Le mélange est incubé pendant 15 min à 37 °C

3e étape : Elongation

Ajout de:

(α-^{33}P)dATP	5 µCi
dithiothréitol (DTT) 100 mM	1 µl
T7 ADN polymérase	2 unités
Mélange d'extension 5x	2 µl

(dCTP, dGTP, dTTP 7,5 µM chaque)

Le mélange est incubé 5 min à température ambiante

4e étape : Arrêt de la réaction

Mélange précédent	3,5 µl
2'-3' didésoxynucléotide triphosphate	2,5 µl

(ddNTP)/dNTP (20 µM/200 µM)

Le mélange est incubé 5 min à 37 °C. La réaction est stoppée par l'ajout de 4 µl de bleu de formamide. Les produits de la réaction sont fractionnés sur un gel de polyacrylamide dénaturant (polyacrylamide 6%/ urée 8M). Après migration, l'ADN est fixé sur le gel par trempage dans de l'acide acétique 10% (v/v). Les bandes d'ADN élongué sont révélées par autoradiographie.

II.4) Mutagenèse dirigée.

II.4.1) Mutagenèse selon Deng et Nickoloff.

II.4.1.1) Principe de la méthode (Deng et Nickoloff, 1992).

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide d'un protocole mis au point au laboratoire par François Talfournier et dont le principe était fondé sur l'élimination d'un site unique de restriction non essentiel (procédure développée par Deng et Nickoloff, 1992). La méthode utilise un système double amorce pour générer les mutations site-spécifiques. Une amorce (oligonucléotide de mutagenèse) introduit la mutation désirée sur le gène. Une autre amorce (oligonucléotide de crible) élimine un site unique de restriction non essentiel, ce qui permettra de sélectionner les plasmides mutés. Les deux amorces s'hybrident sur le même brin du plasmide dénaturé (figure 7 page 46a).

II.4.1.2) Phosphorylation des oligonucléotides.

Les oligonucléotides sont phosphorylés en 5' pour permettre ultérieurement à la ligase de fermer le brin circulaire néosynthétisé.

Oligonucléotide	300 pmoles
ATP 10 mM	3μl
Tampon kinase 10x	3μl
(Tris-HCl 70 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 5 mM, pH 7,5)	
T4 polynucléotide kinase	1 unité
H_2O	qsp 30 μl

Le mélange est incubé 30 min à 37°C, puis 10 min à 70°C pour inactiver l'enzyme.

II.4.1.3) Hybridation des amorces et synthèse du brin muté complémentaire.

Plasmide db	0,025 pmole
Oligonucléotide de crible	25 pmoles
Oligonucléotide de mutagenèse	25 pmoles
Tampon mutA 10x	2 μl
(Tris-HCl 0,2 M, $MgCl_2$ 0,1 M, DTT 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5)	
H_2O	qsp 20 μl

Le mélange d'hybridation est incubé à 100°C pendant 5 min, puis immédiatement placé à 0°C pendant 5 min et incubé à 37°C pendant 30 min.

La réaction d'élongation est ensuite réalisée en ajoutant :

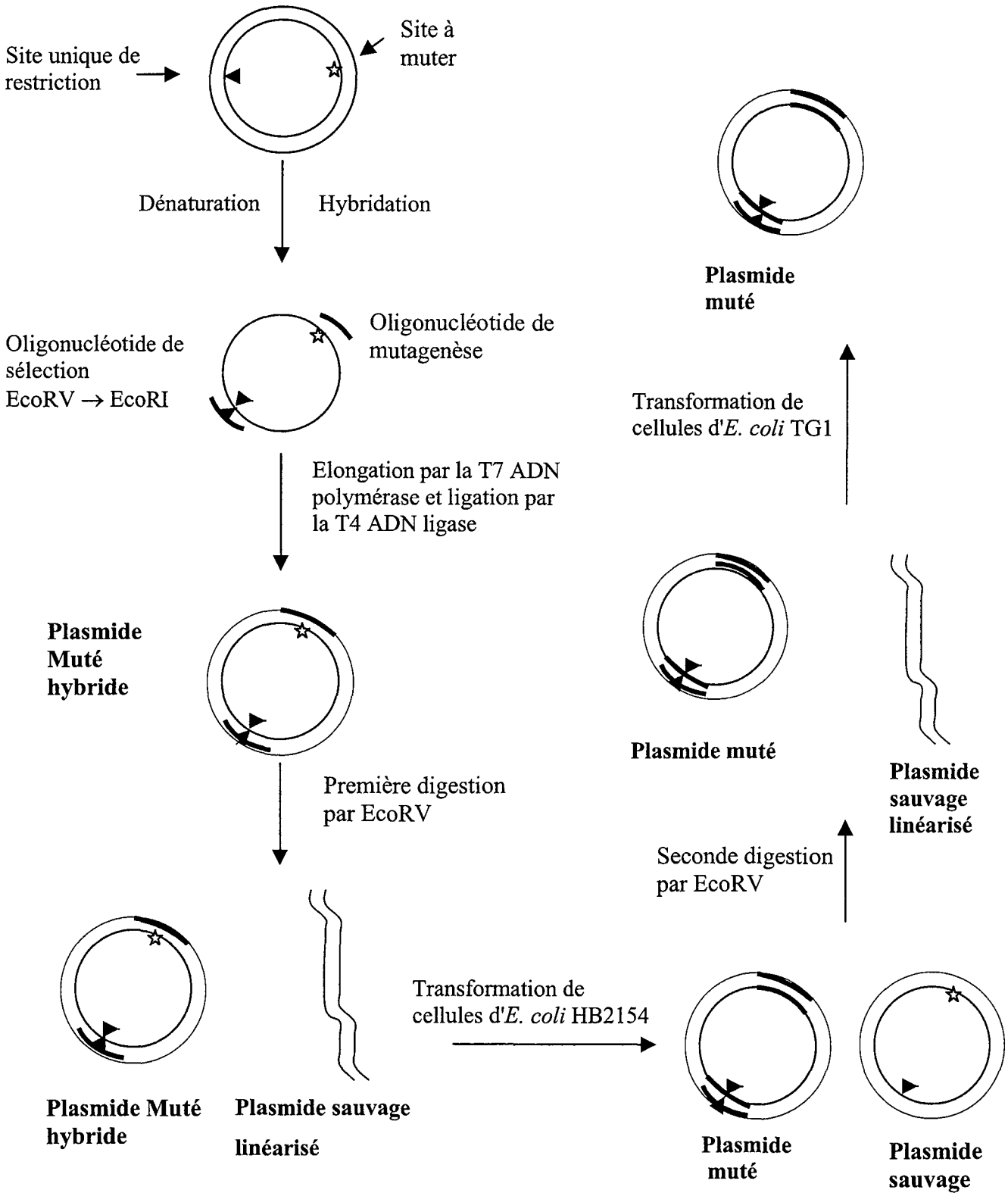


Figure 7 : Les différentes étapes de la mutagénèse dirigée basée sur l'élimination d'un site unique de restriction (protocole mis au point à partir de la procédure développée par Deng & Nickoloff).

Tampon mutB 10x	2 μl
(Tris-HCl 0,2 M, $MgCl_2$ 0,1 M, DTT 0,1 M, pH 8,5)	
dNTPs 10 mM	2 μl
ATP 10 mM	2 μl
T7 DNA polymérase	5 unités
T4 DNA ligase	3 unités
H_2O	qsp 20 μl

Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 à 3 heures. L'élongation est alors stoppée en chauffant à 85°C pendant 15 min puis le mélange est placé à 0°C.

II.4.1.4) Première sélection des plasmides mutés.

Les plasmides sauvages, contenant encore le site unique de restriction, sont linéarisés avec l'enzyme de restriction correspondante.

Mélange d'élongation	40 μl
Tampon EcoRV 10x	5 μl
EcoRV (10U/μl)	1 μl
H_2O	qsp 50 μl

Le mélange de digestion est incubé à 37°C pendant 2 heures. 20 μl de ce mélange sont ensuite utilisés pour transformer des cellules compétentes de la souche d'*E. coli* HB2154. Cette souche étant mutée dans un gène essentiel du système de réparation (gène *mutL*), elle est incapable de corriger le mésappariement des bases. Le mélange de transformation est alors mis en culture une nuit dans 5 ml de milieu LB contenant de l'Amp à 100 μg/ml.

II.4.1.5) Seconde sélection des plasmides mutés.

Dans le but d'améliorer le rendement de mutagenèse, une seconde digestion par l'enzyme de restriction EcoRV est effectuée sur une minipréparation d'ADN plasmidique réalisée à partir des cellules HB2154 transformées.

ADN plasmidique	500 ng
Tampon EcoRV 10x	5 μl
EcoRV (10U/μl)	1 μl
H_2O	qsp 50 μl

Le mélange de digestion est incubé à 37°C pendant 2 heures. 1 μl d'enzyme est ajouté et l'incubation est poursuivie pendant 2 heures à 37°C. Ce mélange est ensuite utilisé pour transformer des cellules compétentes de la souche d'*E. coli* TG1.

II.4.2) Mutagenèse selon Kunkel.

II.4.2.1) Principe de la méthode (Kunkel, 1985; Kunkel *et al.*, 1991).

La mutagenèse de Kunkel s'effectue sur un sb d'ADN enrichi en uracile, synthétisé dans la souche d'*E. coli* CJ236 mutée dans la voie métabolique des bases pyrimidiques et qui accumule donc le 2'-désoxyuracile triphosphate (dUTP). L'oligonucléotide de mutagenèse est hybridé au sb, et le deuxième brin est synthétisé par la T4 ADN polymérase assistée par la T4 ADN ligase *in vitro*. Les cellules TG1, transformées par le mélange de mutagenèse, vont dégrader le brin polyuracilé non muté et fixer ainsi préférentiellement la mutation sur le db (figure 8 page 48a)

II.4.2.2) Phosphorylation de l'oligonucléotide.

Oligonucléotide	300 pmoles
ATP 10 mM	3 µl
Tampon kinase 10x	3 µl
(Tris-HCl 70 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 5mM, pH 7,5)	
T4 polynucléotide kinase	1 unité
H_2O	qsp 30 µl

Le mélange est incubé 30 min à 37 °C, puis 10 min à 70 °C pour inactiver l'enzyme.

II.4.2.3) Préparation du sb riche en uracile.

Le sb enrichi est préparé à partir des plasmides pSKBstII contenus dans la souche d'*E. coli* CJ236 comme indiqué dans le paragraphe II.2.2.

II.4.2.4) Mutagenèse.

1re étape : Hybridation de l'oligonucléotide au simple brin

Plasmide pSKBstII polyuracilé	0,2 µg
Oligonucléotide phosphorylé	10 pmoles
tampon 10x	1 µl
(Tris-HCl 200 mM, $MgCl_2$ 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4)	
H_2O	qsp 10 µl

Le mélange est incubé 10 min à 70 °C, puis retour lent à 42 °C

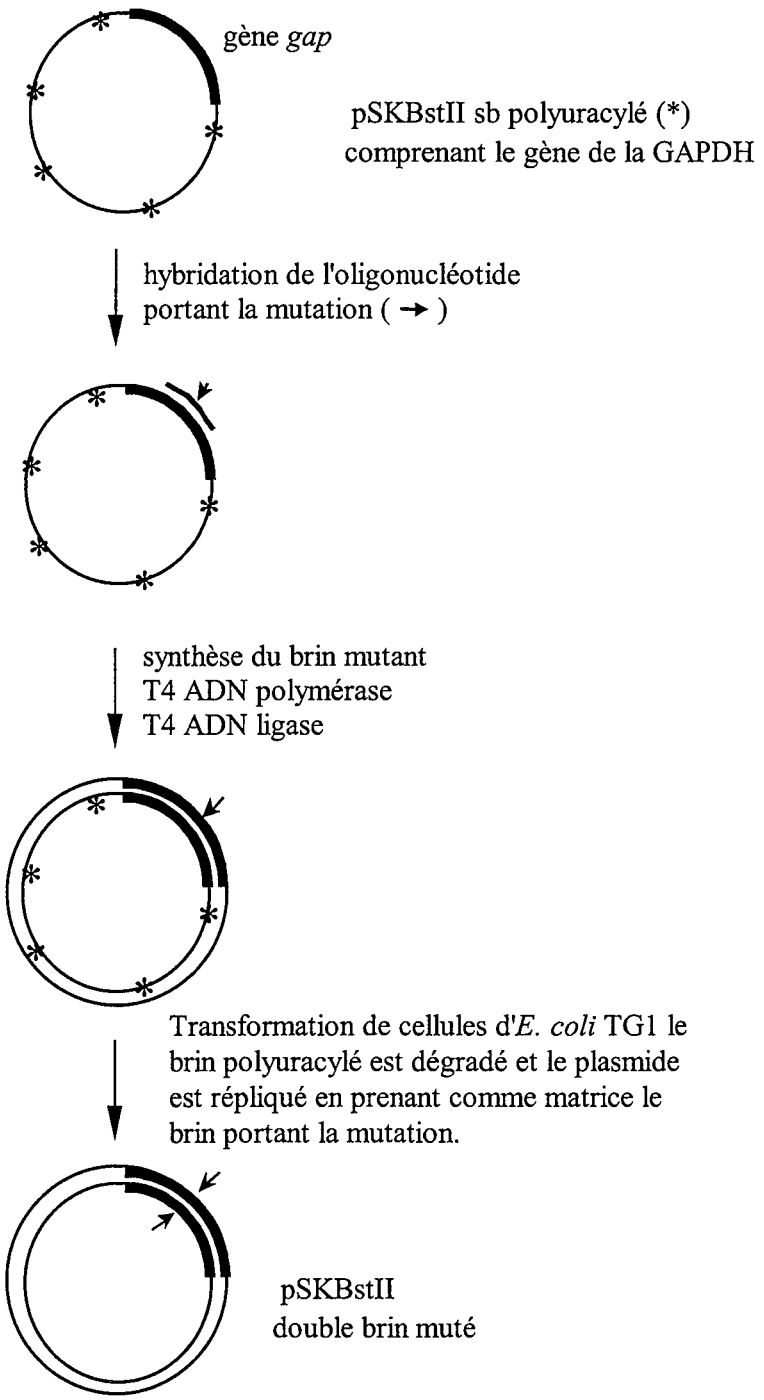


Figure 8 : Principe de la mutagenèse de Kunkel

10 min à 37 °C, 10 min à température ambiante.

2e étape : Synthèse du brin muté

On ajoute au mélange précédent :

Tampon de synthèse 10 x	2 µl
(Tris-HCl 200 mM, $MgCl_2$ 50 mM, DTT 20 mM, pH 7,4)	
T4 ADN ligase	2 unités
T4 ADN polymérase	2 unités
H_2O	qsp 20 µl

5 min dans la glace, 5 min à 25 °C, 4 h à 37 °C.

Arrêt de la réaction par 90 µl de tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8

3e étape: Transformation de cellules TG1

La transformation est réalisée avec 10 µl du mélange de mutagenèse et 90 µl de cellules compétentes. Les cellules sont étalées sur boîte LB avec Amp.

En général, une vingtaine de clones est obtenue par cette méthode avec un taux de mutation variant de 10 à 80%. Les clones sont testés d'abord par PCR pour vérifier la présence du gène de la GAPDH, puis la région de la mutation est séquencée.

II.4.3) Mutagenèse selon la réaction de polymérisation en chaîne (PCR, pour polymerase chain reaction).

II.4.3.1) Principe de la méthode.

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du Kit « QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit » commercialisé par Stratagene. La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* (6 fois plus fidèle, dans la réplication de l'ADN que l'ADN polymérase thermostable *Taq*) pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité et sans déplacer les oligonucléotides de mutagenèse, ainsi qu'un appareil de PCR (Thermal cycler). La méthode nécessite un plasmide double brin super-enroulé et 2 oligonucléotides de mutagenèse portant chacun la mutation. Les oligonucléotides, chacun complémentaire d'un brin du plasmide, vont servir d'amorces pour la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase thermostable *Pfu,* lors des cycles de température, qui conduit à un plasmide muté aux extrémités non religuées. Le produit de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est ensuite traité avec l'endonucléase *Dpn* I (séquence cible 5'-G^{m6}ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, pour digérer l'ADN parental et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. L'ADN isolé de la plupart des souches d'*E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *Dpn* I. Une fraction du mélange de digestion, contenant l'ADN double brin muté, circulaire et

coupé, est utilisée pour transformer des bactéries XL1-*Blue* super-compétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté (figure 9 page 50a).

II.4.3.2) Phosphorylation des oligonucléotides.

Oligonucléotide	300 pmoles
ATP 10 mM	3 µl
Tampon kinase 10x	3 µl
(Tris-HCl 70 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 5mM, pH 7,5)	
T4 polynucléotide kinase	1 unité
H_2O	qsp 30 µl

Le mélange est incubé 30 min à 37 °C, puis 10 min à 70 °C pour inactiver l'enzyme.

II.4.3.3) Mutagenèse.

1ère étape : Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Plasmide double brin	50 ng
oligodésoxynucléotide 1	125 ng
oligodésoxynucléotide 2	125 ng
tampon PCR 10x	5 µl
dNTP (1,25 mM de chaque)	1 µl
Pfu polymérase (Boehringer)	2,5 unités
H_2O	qsp 50 µl

La réaction est effectuée sur un appareil Perkin-Elmer par répétition de 16 cycles, chaque cycle comprenant une étape de dénaturation (30 sec à 95 °C), une étape d'hybridation (1 min à 55 °C) et une étape d'élongation (12 min à 68 °C).

Le produit issu de la réaction de PCR est ensuite incubé dans la glace, de façon à ce que sa température devienne inférieure à 37°C.

2^{éme} étape : Digestion du produit de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Produit de la PCR :	50 µl
Dpn I	10 unités

Le mélange de digestion est ensuite incubé pendant 1 heure à 37°C.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

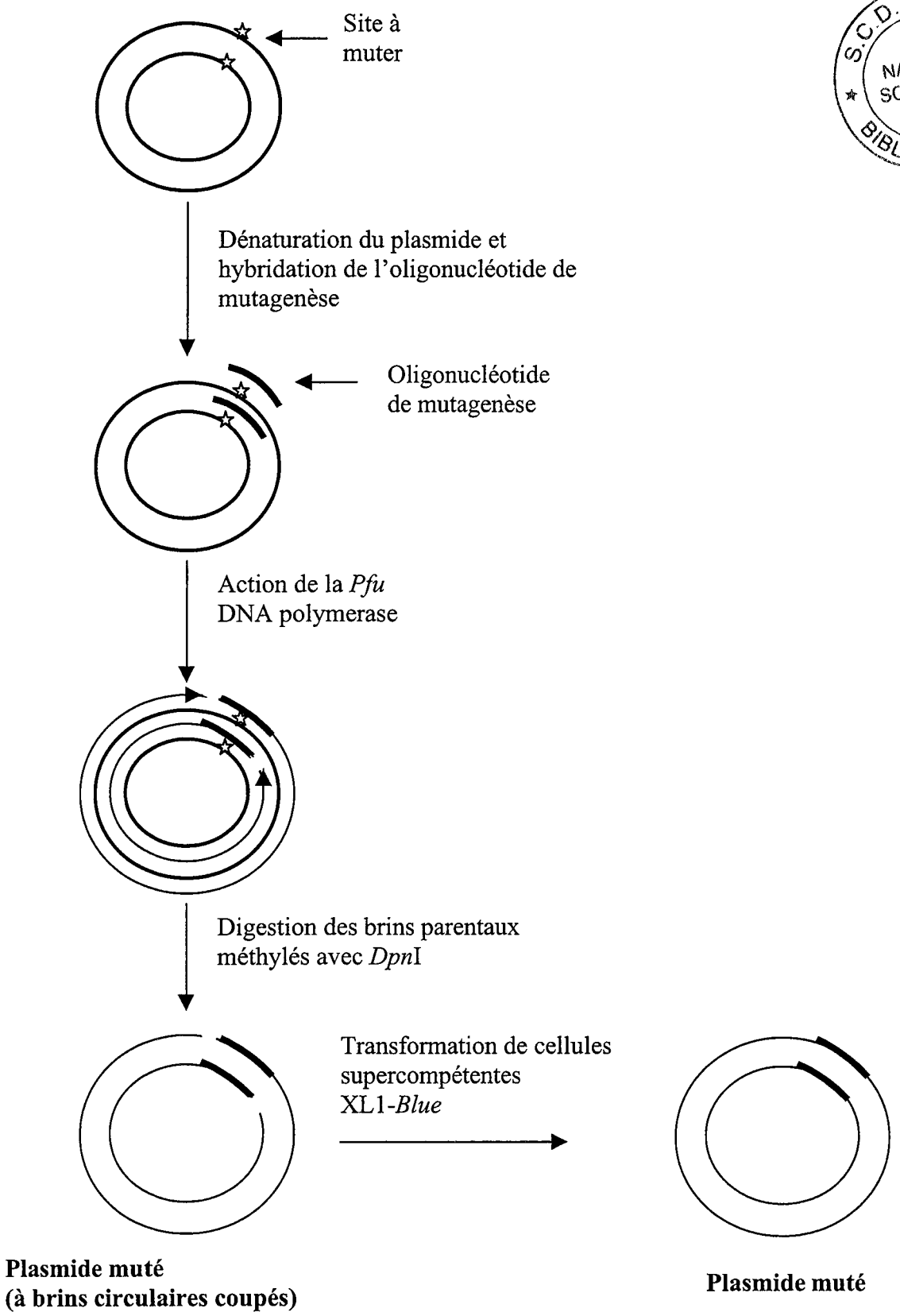


Figure 9 : Mutagenèse selon la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

3^{éme} étape : Transformation des bactéries super-compétentes

La transformation est réalisée avec 10 µl du mélange de mutagenèse et 50 µl de bactéries XL1-*Blue* super-compétentes. Les cellules sont étalées sur boîte LB avec Amp.

En général, une vingtaine de clones est obtenue par cette méthode avec un taux de mutation variant de 50 à 80%. Les clones sont séquencés pour vérifier la présence de la mutation désirée et l'absence de toute autre mutation.

III) Production, purification et caractérisation de la GAPDH.

III.1) Production des GAPDH sauvage et mutées de *B. stearothermophilus*.

Les mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sont produits dans les souches DH5α ou HB101 transformées par le plasmide recombinant pSKBstII portant le gène de la GAPDH muté.

Les cultures sont ensemencées au 1/100ème en milieu LB-Amp et sont placées pendant 30 à 36 h à 37 °C sous agitation. Les cellules récoltées par centrifugation à 3000 g sont lavées au tampon A (saccharose 25%, EDTA 5 mM, Tris-HCl 5mM, pH 7,5) et stockées à -20 °C.

III.2) Purification des GAPDH sauvage et mutées de *B. stearothermophilus*.

III.2.1) Sonication et précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium.

Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de tampon de purification (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8) par litre de culture et lysé par un traitement aux ultrasons à 0°C sous une puissance de 20W pendant 1,5 min, par périodes de 1 s d'ultrasons et 1 s d'arrêt. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 30000 g pendant 1 h.

Le surnageant de sonication est amené à 66% de saturation en sulfate d'ammonium et on laisse précipiter pendant 1 h à 4°C sous agitation. La GAPDH, restée en solution, est récupérée dans le surnageant après centrifugation pendant 1 h à 30000g et le surnageant est amené à 92% de saturation en sulfate d'ammonium. A cette concentration en sel, la GAPDH précipite et une dernière centrifugation après 4 h à 4°C sous agitation permet de la récupérer dans le culot.

III.2.2) Filtration sur gel.

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon de purification puis déposé sur une colonne de gel filtration ACA 34 (acrylamide 3% , agarose 4% , BIOSEPRA) dont le domaine de fractionnement se situe entre 20 et 300 kDa. L'élution qui s'effectue dans le même tampon est suivie par la lecture de la DO à 260 et 280 nm. Les fractions contenant la GAPDH (fractions pour lesquelles le rapport DO_{280}/DO_{260} est proche de 1) sont rassemblées.

III.2.3) Chromatographie échangeuse d'anions.

La solution contenant la GAPDH est diluée pour obtenir une DO_{280} égale à 1 puis injectée sur une colonne Sépharose Q préparative (agarose 6% comprenant des groupements triméthylammonium méthyles, Pharmacia), équilibrée dans le tampon de purification et couplée à un système FPLC (Pharmacia). L'enzyme de type sauvage et les mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sont élués à partir d'un gradient linéaire croissant de 0 à 300 mM de KCl, sous un débit de 5 ml/min. Cette étape permet de séparer la protéine des fragments d'acides nucléiques encore présents après filtration sur gel.

III.2.4) Chromatographie hydrophobe.

Les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions et contenant la GAPDH de *B. stearothermophilus* sont rassemblées et amenées à une concentration finale de 1,7 M en sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$). Cette solution est ensuite injectée sur une colonne Phenyl Sepharose préparative (agarose 6% comprenant des groupements phenyl, Pharmacia), équilibrée dans le tampon de purification + 1,7 M $(NH_4)_2SO_4$ et couplée à un système FPLC (Pharmacia). L'enzyme de type sauvage et les mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sont élués à partir d'un gradient linéaire décroissant de 1,7 à 0 M en $(NH_4)_2SO_4$, sous un débit de 5 ml/min. Cette dernière étape permet de purifier la GAPDH de *B. stearothermophilus* à homogénéité.

III.3) Préparation de la forme apoenzyme des différentes GAPDHs de *B. stearothermophilus*.

Pour préparer la forme apoenzyme, deux techniques ont été employées : la première consiste à traiter l'enzyme au charbon activé :

GAPDH (précipité)	20 mg
charbon actif	100 mg
EDTA 5 mM pH 8	qsp 5 ml

Le mélange est incubé 5 min dans la glace puis le charbon est éliminé par filtration sous vide. Le rapport DO_{280}/DO_{260} est alors supérieur à 1,8.

La seconde technique consiste à injecter la solution contenant la GAPDH, préalablement dialysée contre du tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2mM, pH 8,0, sur une colonne Affi-blue Gel (BIORAD) équilibrée dans le même tampon et couplée à un système FPLC. L'élution est alors réalisée par un saut brutal de concentration en KCl de 0 à 1M. Suivant les préparations le rapport DO_{280}/DO_{260} est compris entre 1,8 et 2. Les sels sont ensuite éliminés par dialyse à 4°C contre le tampon désiré.

III.4) Détermination de l'état oligomérique des GAPDHs mutées.

III.4.1) Filtration sur gel : Superose 12 couplée au système FPLC.

Le support chromatographique de cette colonne est constitué de particules d'agarose réticulé de 10 μm de diamètre. Les pores représentent 55% du volume et la gamme de séparation s'étend de 1 à 300 kDa. L'injection de l'échantillon protéique (0,5 mg dans 200 μl) se fait grâce à une boucle d'injection avec un débit de tampon (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, KCl 150 mM, pH 8) de 0,2 ml/min. La colonne, d'une contenance de 23 ml, a été étalonnée avec un mélange de marqueurs de poids moléculaire. La détermination du volume mort (*Vo*) et du volume total (*Vt*), respectivement 6,9 et 18,2 ml, permet de calculer le coefficient de partition K_{av} selon $K_{av} = \frac{(Ve - Vo)}{(Vt - Vo)}$ avec *Ve* volume d'élution de la protéine.

III.4.2) Phényl Superose HR 5/5 couplée au système FPLC.

Le support chromatographique Phenyl Superose est dérivé de la Superose 12, sur lequel ont été greffés de façon covalente des résidus phényls hydrophobes. La colonne a une contenance de 1 ml. L'injection des échantillons protéiques (0,5 mg dans 200 μl) se fait via une boucle d'injection avec un

débit de 0,2 ml/min. L'élution est réalisée par un gradient décroissant et linéaire de $(NH_4)_2SO_4$ de 1,7 M à 0 M en 90 min. Le débit (tampon A : Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 1,7 M, pH 8 et tampon B : Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8) est de 0,2 ml/min.

III.4.3) Ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Le gradient de saccharose est préparé à partir de 6 ml de chaque solution : A (20 g de saccharose dans 100 ml final de tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8) et B (5 g de saccharose dans 100 ml final de tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8). Les échantillons protéiques sont alors déposés à la surface du liquide. Les tubes contenant le gradient de saccharose sont ensuite centrifugés à 39 000 rpm pendant 24 h, en utilisant le rotor SW 41, à la température de 20°C. 24 fractions de 500 μl sont prélevées à la surface des tubes, en prenant garde de ne pas perturber le gradient. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976). Les constantes de sédimentation sont calculées selon la formule de Stancel et Gorski (1975).

III.4.4) Ultracentrifugation analytique.

La technique d'ultracentrifugation analytique, introduite par Svedberg dans les années 20, permet d'étudier les propriétés hydrodynamiques et thermodynamiques d'une macromolécule (coefficients de sédimentation et de diffusion, masse moléculaire, constantes d'association dans les processus d'interactions intermoléculaires).

III.4.4.1) Principe

Lorsqu'une particule de soluté est placée dans un champ de gravité, elle est soumise à trois forces :

- force de sédimentation (F_1) :

$$F_1 = mw^2r = \frac{M}{N}w^2r \qquad (1)$$

avec m : masse de la particule (en g)

ω : vitesse angulaire du rotor (en radian/sec)

r : distance radiale ou distance à l'axe du rotor (en cm)

M : masse molaire de la particule (en g/mole)

N : nombre d'Avogadro ($6{,}023 \times 10^{23}$)

- force de flottaison (F_2) :

$$F_2 = -m_0\omega^2 r = -m\bar{v}\rho\omega^2 r = \frac{M}{N}\bar{v}\rho\omega^2 r \qquad (2)$$

avec m_0 : masse de solvant déplacé par la particule (en g)

$\bar{v}$: volume spécifique partiel (en ml/g)

ρ : densité du solvant (en g/ml)

- force de frottement (F_3) : (3)

$$F_3 = -f \times \frac{dr}{dt}$$

avec f : coefficient de friction (en g/sec)

$\frac{dr}{dt}$: vitesse de sédimentation de la particule (en cm/sec)

Très rapidement les trois forces s'équilibrent et :

$$F_1 + F_2 + F_3 = 0 \qquad (4)$$

Par la relation (4), on obtient l'équation de Svedberg qui définit le coefficient de sédimentation s comme la vitesse de sédimentation par unité de champ de force centrifuge.

$$s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Nf} \quad \text{et} \quad f = \frac{RT}{D} \qquad (5)$$

avec R : constante des gaz parfaits (8,313 $J.mol^{-1}K^{-1}$)

T : température absolue (en Kelvin)

D : coefficient de diffusion (en cm^2/sec)

Le coefficient de sédimentation est exprimé en svedberg (S) (1 S = 10^{-13} secondes)

III.4.4.2) Instrumentation

La sédimentation des macromolécules est suivie pendant le déroulement de l'expérience grâce à un système optique qui mesure l'absorption de la lumière par les particules étudiées, à une longueur d'onde qui leur est propre.

Le modèle d'ultracentrifugeuse analytique utilisé au Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurale, UPR-CNRS 9063 (*XL-A Optima* de Beckman) est constitué des éléments suivants :

(i) un rotor qui peut être soumis à une vitesse élevée, à une température donnée. Ce rotor accepte plusieurs cellules de sédimentation qui sont constituées de deux compartiments dans

lesquels sont placées les macromolécules en suspension dans un solvant (compartiment de l'échantillon) et le solvant seul (compartiment de référence).

(ii) Un système optique comprenant une source lumineuse, un monochromateur et un détecteur. La source lumineuse est une lampe au xénon de haute intensité et qui possède un large spectre de longueurs d'onde, le monochromateur permet de sélectionner une longueur d'onde du spectre de lumière émis par la source lumineuse et le détecteur est un photomultiplicateur précis et résolutif qui permet de mesurer les différences de concentration moléculaire tout au long de la cellule de sédimentation. L'acquisition et l'analyse des données se font par un système de logiciels informatiques.

Cette technique permet de réaliser la vitesse de sédimentation.

III.4.4.3) Vitesse de sédimentation

Les particules en suspension dans un solvant sont soumises à des vitesses angulaires suffisamment élevées pour provoquer une sédimentation rapide du soluté vers le fond de la cellule. On assiste alors à la formation d'une frontière fine et nette entre la partie supérieure de la cellule qui ne contient plus de soluté et la partie inférieure de la cellule où la concentration en soluté est uniforme. Le coefficient de sédimentation est déterminé par la mesure de la vitesse de progression de la frontière au cours du temps. La valeur du coefficient de sédimentation est corrigée par rapport à des conditions standards (à 20°C, dans de l'eau) et extrapolée à une dilution infinie ($S^0_{20,w}$).

La méthode du point d'inflexion (logiciel XLAVEL) a été utilisée pour obtenir le coefficient de sédimentation. Cette méthode consiste à mesurer la vitesse de progression de la frontière au niveau du point d'inflexion de la courbe représentative de l'absorbance en fonction de la distance radiale, $A = f(r)$, point qui correspond au maximum du pic de la courbe dérivée, $dA/dr = f(r)$. La représentation du logarithme de la distance radiale du point d'inflexion (r_{inf}) en fonction du produit du carré de la vitesse angulaire par le temps, $Lnr_{inf} = f(\omega^2 t)$, donne une droite dont la pente est le coefficient de sédimentation s. Cette méthode qui convient parfaitement à un système composé d'une seule espèce moléculaire, ne permet de déterminer qu'un coefficient de sédimentation moyen dans le cas d'un système composé de plusieurs espèces.

III.4.4.4) Détermination des autres paramètres hydrodynamiques.

La masse moléculaire est déterminée soit :

(i) par l'équation de Svedberg (équation 5) si les valeurs des coefficients de sédimentation et de diffusion sont connues,

$$M = \frac{s \times RT}{D(1 - \rho \bar{v})}$$

(ii) en utilisant une protéine de référence, l'albumine de sérum de bœuf (BSA), dont la masse et le coefficient de sédimentation sont connus et en utilisant la relation suivante :

$$\left(\frac{s_1}{s_2}\right)^3 = \left(\frac{M_1}{M_2}\right)^2$$

avec s_1 et M_1 : coefficient de sédimentation et masse moléculaire de la BSA.

s_2 et M_2 : coefficient de sédimentation et masse moléculaire de la macromolécule étudiée.

Cette relation ne permet d'obtenir qu'une valeur approximative de la masse moléculaire et ne doit être utilisée que pour des protéines qui présentent un degré d'asymétrie comparable à celui de la BSA.

Le coefficient de friction, qui dépend de la taille et de la forme de la particule, est défini par la relation suivante :

$f = \frac{kT}{D} = 6\pi\eta R$, avec k : constante de Boltzman

η : viscosité du solvant (en centipoise)

R : rayon de la particule (en cm)

Le rayon de la particule peut être celui de la sphère anhydre (Rmin) ou celui de la sphère hydratée (R).

$R\min = \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N}\right)^{1/3}$ et $R = \left(\frac{3M(\delta + \bar{v})}{4\pi N}\right)^{1/3}$, avec δ : hydratation de la protéine

La valeur du coefficient de friction augmente avec le degré d'asymétrie de la particule. L'asymétrie est estimée en comparant la valeur du coefficient de friction de la particule avec celle du coefficient de friction d'une sphère parfaite ($f_0 = {kT}/{D} = 6\pi\eta R_0$). Ainsi, par des expériences de vitesse de sédimentation, on peut obtenir des renseignements sur la masse, la taille et la forme d'une macromolécule.

III.4.5) Spectrométrie de masse en conditions natives.

En 1991, il est apparu que l'on pouvait volatiliser/ioniser des édifices supramoléculaires en préservant leurs interactions spécifiques non covalentes, grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique d'ionisation, l'électrospray (ES) et en prenant un certain nombre de précautions expérimentales. La spectrométrie de masse supramoléculaire permet de mesurer la masse de complexes constitués de plusieurs molécules associées par l'intermédiaire de liaisons non covalentes spécifiques, enzyme oligomérique et complexe enzyme oligomérique-NAD dans notre cas. Cela nécessite la mise au point à la fois de conditions appropriées pour la préparation de l'échantillon et pour le réglage du spectromètre de masse, en particulier celui de l'interface (ES).

L'enzyme initialement sous forme de précipité de sulfate d'ammonium est dialysée en présence de tampon NH_4HCO_3 25 mM, pH 7,8 puis injectée sur une colonne échangeuse d'anions à laquelle on applique un gradient de 25 à 200 mM en NH_4HCO_3 pH 7,8. Elle est ensuite aliquotée, lyophilisée et analysée au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, CNRS-UMR 7509, Strasbourg. Avant d'être analysée par spectrométrie de masse électrospray, elle est reprise dans le tampon NH_4HCO_3 25 mM, pH 7,8 et additionnée ou non de NAD tamponné. La gamme de m/z (en thomsons) observée pour les complexes non covalents est plus élevée que celles obtenues lors de l'analyse de cette protéine en conditions dénaturantes (H_2O / $CH_3C{\equiv}N$: 1 /1) et le nombre net de charges portées par la protéine est peu élevé parce que le maintien de la conformation native nécessite de travailler à des pH proches du pH physiologique. Pour rappel, m, M et z représentent respectivement la masse de l'édifice protoné, la masse de la protéine et le nombre de protons et sont reliés par la formule m = M+z.

III.4.6) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant sauf que les échantillons ne sont pas dénaturés et que les gels et le tampon d'électrophorèse sont privés de dodécylsulfate de sodium (SDS).

III.5) Caractérisation de la GAPDH.

III.5.1) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant.

Ce type d'électrophorèse (Laemmli, 1970) permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de la purification. Après concentration des protéines par migration dans un gel à 5%,

celles-ci sont séparées suivant leur taille dans un gel à 10%. Les échantillons sont dénaturés par chauffage avant dépôt ; le gel et le tampon d'électrophorèse (tampon glycine), contiennent du dodécylsulfate de sodium (SDS).

Les protéines sont colorées spécifiquement par le bleu de Coomassie à 0,2% (p/v) ou par le nitrate d'argent, en fonction des quantités déposées sur le gel.

III.5.2) Détermination de la masse moléculaire.

La masse moléculaire du monomère de GAPDH après purification est déterminée par spectrométrie de masse électrospray. Etant donné que cette technique nécessite un échantillon débarrassé de toute trace de sels, la solution de GAPDH est injectée sur une colonne analytique en phase inverse (C8) puis éluée par un gradient linéaire 0 - 80% en acétonitrile. L'échantillon lyophilisé est analysé au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (Dr Van Dorsselaer, CNRS-UMR 7509, Strasbourg). La masse du monomère des différentes GAPDH, sauvage et mutées, a été ensuite déterminée, et comparée à la masse théorique calculée sur la base de 35944 Da pour la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

III.5.3) Mesure de la concentration.

La concentration en GAPDH tétramérique d'un échantillon est estimée à partir de la densité optique mesurée à 280 nm en prenant comme coefficient d'extinction molaire :

- pour l'enzyme tétramérique de *B. stearothermophilus* sous la forme holo $1,31 .10^5 M^{-1} cm^{-1}$ et sous la forme apo $1,17 .10^5 M^{-1} cm^{-1}$ (Corbier *et al*, 1990a).
- pour l'enzyme dimérique de *B. stearothermophilus* sous la forme apo $5,85 .10^4 M^{-1} cm^{-1}$

III.5.4) Tests enzymatiques : cas des GAPDH sauvage ou mutées de *B. stearothermophilus*.

III.5.4.1) Dans le sens phosphorylation oxydative.

Les tests d'activité sont effectués dans du tampon Ferdinand (KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0,2 mM, triéthanolamine 40 mM, pH 8,9) en présence de NAD et de G3P à concentrations saturantes dans un volume de 0,5 ml en suivant l'apparition de NADH à 340 nm (Ferdinand, 1964) . L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en µmoles de NADH apparues par min et par unité de DO à 280 nm.

III.5.4.2) Dans le sens déphosphorylation réductive.

Les tests d'activité sont effectués dans du tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5 en présence de NADH et de 1,3dPG dans un volume final de 0,5 ml. La réaction est déclenchée par l'addition de l'extrait enzymatique.

IV) Techniques d'étude des propriétés enzymatiques des GAPDH mutées de *B. stearothermophilus*.

IV.1) Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire.

IV.1.1) G3P, NAD, Pi.

Les mesures sont effectuées dans le tampon Ferdinand (KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0,2 mM, triéthanolamine 40 mM, pH 8,9) dans les conditions du test d'activité décrit ci-dessus (§III.5.4.1). Dans le cas où l'on veut déterminer les paramètres cinétiques pour le phosphate inorganique Pi, le tampon utilisé est le même mais sans phosphate. La concentration du substrat à étudier est variable de 0,2 à 5 K_M, sauf quand la valeur de K_M est trop élevée pour que cette règle soit respectée, les autres substrats se trouvant à concentration saturante. Le K_M du NAD pour certains mutants est sensiblement augmenté, il est alors nécessaire de travailler à fortes concentrations : pour éviter tout effet lié au pH, les solutions stock de NAD sont tamponnées. Les concentrations en enzyme dépendent de l'activité spécifique des enzymes sauvage et mutées et sont choisies de façon à mesurer la vitesse initiale de la réaction sur toute la gamme de concentrations du substrat variable.

Les points expérimentaux sont analysés par régression non linéaire avec l'équation de Michaelis-Menten dans le cas du NAD, G3P et Pi, avec l'équation de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le substrat dans le cas du G3P (Fersht, 1985) :

équation sans inhibition par le substrat : $$v = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{K_M + [S]}$$

équation avec inhibition par le substrat : $$v = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{[S] + K_M(1 + [S]/Ki)}$$

IV.1.2) NADH et 1,3dPG.

Les conditions utilisées sont celles du test d'activité dans le sens déphosphorylation réductive décrit au §III.5.4.2, et suivent les principes décrits au paragraphe précédent. Les valeurs de kcat et K_M sont déduites par régression non linéaire sur l'équation de Michaelis-Menten.

IV.2) Etude de l'étape d'acylation en absence de phosphate.

Les mesures sont effectuées dans le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5 en présence de concentrations saturantes en substrats. Les concentrations en enzyme varient de 8 à 16 μN (concentration en sites), de façon à pouvoir observer un saut de DO à 340 nm allant de 0,05 à 0,1 si la vitesse de réaction est rapide. Dans le cas où la vitesse de réaction est rapide, seule la vitesse de déacylation peut être déterminée, la vitesse d'acylation nécessitant une étude en cinétique de mélange rapide (Stopped-flow).

IV.3) Etude des étapes de la réaction en cinétique de mélange rapide (Stopped-flow).

Les mesures de cinétique rapide ont été réalisées sur un appareil de type BIOLOGIC (SFM3). Les données sont directement enregistrées sur un PC permettant d'exploiter les résultats par régression non linéaire grâce au logiciel BIOKINE.

V) Techniques d'étude des interactions entre la GAPDH de *B. stearothermophilus* et le NAD.

V.1) Inactivation par l'iodoacétamide (IAM).

V.1.1) Principe.

L'IAM est un agent alkylant qui réagit sur les cystéines accessibles, comme c'est le cas pour la Cys149 (Webb, 1963, 1966). La modification covalente de la Cys149 conduit à une perte totale d'activité. Le modèle cinétique de cette inactivation est le suivant :

$$E + nI \xrightarrow{k} (E - I)^n$$

$$v = \frac{d[E]}{dt} = -k[E][I]^n$$

si [I] >>>[E], $[I]^n$ est constant et $k_{obs} = k\,[I]^n$ est une constante de pseudo premier ordre pour n=1

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{obs}[E]$$

$$\ln\frac{[E_0]}{[E]} = \ln\frac{A_0}{A} = k_{obs}t$$

Le tracé ln A_0/A_t en fonction du temps permet donc de déterminer k_{obs}.

En présence d'un protecteur (P) comme le NAD, le processus d'inactivation peut être ralenti en raison de l'encombrement stérique apporté par le protecteur. Il dépend de la concentration en protecteur.

$$E + P \underset{}{\overset{K_D}{\rightleftarrows}} E{-}{-}P \qquad \text{où} \qquad K_D = \frac{[E][P]}{[E{-}{-}P]}$$

$$E + I \xrightarrow{k1} E - I \qquad \text{enzyme inactive}$$

$$E{-}{-}P \xrightarrow{k2} I - E{-}{-}P \qquad \text{enzyme inactive}$$

Les équations cinétiques s'écrivent:

$$-\frac{d[E_t]}{dt} = k_1[E][I] + k_2[E{-}{-}P][I]$$

$[E_t] = [E] + [E\text{-}P]$, E_t : enzyme totale active

$$\rightarrow [E_t] = [E] + \frac{[E][P]}{K_D}$$

$$\rightarrow [E] = [Et]\frac{K_D}{K_D + [P]}$$

$$[E_t] = \frac{K_D}{[P]}[E{-}{-}P] + [E{-}{-}P]$$

$$\rightarrow [E{-}{-}P] = [E_t]\frac{[P]}{K_D + [P]}$$

$$-\frac{d[Et]}{dt} = k_1[I][E_t]\frac{K_D}{K_D + [P]} + k_2[I][E_t]\frac{[P]}{K_D + [P]}$$

$$-\frac{d[E_t]}{dt} = [I][E_t]\left(k_1\frac{K_D}{K_D + [P]} + k_2\frac{[P]}{K_D + [P]}\right)$$

soit:

$k_0 = k_1[I]$, constante de pseudo-premier ordre en absence de protecteur

k_A, la constante de pseudo-premier ordre en présence de protecteur

$$k_A = [I]\left(k_1 \frac{K_D}{K_D + [P]} + k_2 \frac{[P]}{K_D + [P]}\right)$$

et $$\frac{k_A}{k_0} = \frac{K_D}{K_D + [P]} + \frac{k_2}{k_1} \frac{[P]}{K_D + [P]}$$

d'où $$\frac{k_2}{k_1} = \left(\frac{K_D + [P]}{[P]}\right)\frac{k_A}{k_0} - \frac{K_D}{[P]}$$

$$= \frac{K_D}{[P]}\left(\frac{k_A}{k_0} - 1\right) + \frac{k_A}{k_0}$$

$$\frac{k_A}{k_0} = K_D \frac{1 - k_A/k_0}{[P]} + \frac{k_2}{k_1}$$

Le tracé de $k_A/k_0 = f((1-k_A/k_0)/[P])$ est une droite de pente K_D.

V.1.2) Protocole expérimental.

L'apoenzyme sauvage ou mutée est incubée à 25°C en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 en présence d'IAM à une concentration de 400 µM et de NAD à concentration variable. L'activité résiduelle est mesurée par tests d'activité effectués à 37°C à différents temps d'incubation.

V.2) Mesure de l'affinité du NAD par extinction de fluorescence.

V.2.1) Mesures.

L'extinction de fluorescence du tryptophane par le NAD est une méthode de mesure et de comparaison de l'efficacité de la fixation du cofacteur à la GAPDH (Kelemen *et al*, 1975 ; Branlant *et al*, 1983a ; Corbier *et al*, 1990b ; Clermont *et al*, 1993).

Cette méthode a été employée dans le but de déterminer les constantes de dissociation du NAD pour les sites de fixation indépendants de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, et d'évaluer la nature coopérative ou non de cette fixation, en mesurant l'effet d'additions successives de NAD sur l'intensité de fluorescence de l'apo-protéine à 330 nm (maximum du spectre d'émission), la longueur d'onde d'excitation étant 297 nm (longueur d'onde où seuls les tryptophanes absorbent). Les spectres de fluorescence ont été réalisés sur un spectrophotomètre SAFAS flx. Les fentes utilisées étaient de 10 nm

pour l'excitation et de 10 nm pour l'émission, et la tension du photomultiplicateur réglée de telle façon que la fluorescence de la forme apoenzyme représente les deux tiers du maximum de l'échelle d'intensité de fluorescence (exprimée en unités arbitraires). Les concentrations de NAD ont été déterminées spectrophotométriquement en utilisant comme coefficient d'extinction molaire $1{,}78.10^4$ $M^{-1}.cm^{-1}$ à 259 nm. Les solutions de protéine et de cofacteur sont diluées extemporanément dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Un certain nombre de corrections sont apportées aux intensités mesurées :

- pour la dilution liée à l'ajout de NAD.

- pour l'effet d'écran dû à l'absorption du NAD, sensible en particulier aux fortes concentrations (Hélène *et al*, 1971). Si DOm et DOth représentent respectivement l'absorbance de la solution de GAPDH en présence et absence de cofacteur (corrigée de la dilution) à la longueur d'onde d'excitation et si I_F représente l'intensité de fluorescence, alors la valeur corrigée est déduite de la valeur mesurée par la relation suivante :

$$I_F\text{corrigée} = I_F\text{mesurée}\ \frac{DOm}{DOth}\frac{1-10^{-DOth}}{1-10^{-DOm}}$$

- pour l'émission RAMAN, en soustrayant l'intensité de fluorescence du tampon de celle de l'échantillon.

- pour un effet lié probablement à la liaison aspécifique du NAD à la protéine, observé de façon sensible aux fortes concentrations en NAD, et linéaire par rapport à la concentration en cofacteur. La fluorescence I_F associée à la saturation des sites spécifiques au cofacteur est ainsi déduite de la valeur mesurée I_{Fm} par la relation $I_F = I_{Fm} + a[NAD]_t$, a étant déterminé lors d'expériences effectuées à forte concentration en protéine et cofacteur.

V.2.2) Analyse des mesures.

A partir des intensités de fluorescence I_F corrigée mesurées pour chaque concentration en NAD, le nombre moyen ν de moles de NAD liées par mole d'enzyme peut être déduit à partir de la relation :

$$\nu = n\frac{Fa - F}{Fa - Fh}$$

où n représente le nombre de sites de fixation ; Fa, la fluorescence de l'apoenzyme et Fh, la fluorescence de l'holoenzyme avec ses n sites de fixation saturés par le NAD. Les valeurs de ν et x, la concentration de NAD libre, sont alors ajustées à l'équation de Adair-Klotz par régression non linéaire ce qui permet la détermination des constantes de dissociation macroscopiques *Ki* :

$$v = \frac{\frac{x}{K_1} + \frac{2x^2}{K_1K_2} + ... + \frac{nx^n}{K_1K_2...K_n}}{1 + \frac{x}{K_1} + \frac{x^2}{K_1K_2} + ... + \frac{x^n}{K_1K_2...K_n}}$$

avec x = $[NAD]_t$–n$[E]_t$ où $[NAD]_t$ et $[E]_t$ représentent respectivement les concentrations totales en NAD et en GAPDH.

Les constantes de dissociation macroscopiques sont ensuite converties en constantes de dissociation microscopiques *ki* à l'aide de la relation :

$$ki = \frac{(n-i+1)\times Ki}{i}$$

La coopérativité est estimée à partir du rapport des constantes de dissociation microscopiques k_2/k_1. L'absence de coopérativité est indiquée par $k_2/k_1 = 1$. Un rapport k_2/k_1 significativement supérieur à 1 indique une coopérativité négative alors qu'un rapport k_2/k_1 significativement inférieur à 1 indique une coopérativité positive.

La représentation logarithmique de l'équation de Hill $\log\left(\frac{v}{v_{max} - v}\right) = n_H \log x - \log K'$ avec n_H coefficient de Hill et $K' = x_{0,5}^{n_H}$ où $x_{0,5}$ représente la concentration de x à demi saturation a aussi été utilisée. Une valeur de n_H inférieure, égale ou supérieure à 1 indique respectivement une coopérativité négative, nulle ou positive.

V.3) Mesure de la bande de Racker.

L'apparition de la bande d'absorption lors de la liaison du NAD à la GAPDH est détectée par spectrophotométrie différentielle, dans deux cuves à double compartiment de trajet optique 0,438 cm. Le compartiment avant des deux cuves référence et échantillon contient l'apoenzyme diluée dans du tampon Tris-HCl 100 mM, EDTA 0,2 mM pH 8, le compartiment arrière contenant le tampon seul. La concentration précise en protéine est déduite d'un spectre d'absorption à chaque expérience.

Le coenzyme est ensuite ajouté à concentration variable dans le compartiment avant de la cuve échantillon et dans le compartiment arrière de la cuve référence, permettant de corriger le spectre de l'absorption liée au cofacteur libre. Un volume identique de tampon est ajouté dans la solution enzymatique de référence pour annuler l'effet de la dilution. Un spectre d'absorption est enregistré entre 500 et 300 nm pour chaque concentration en NAD et permet de mesurer l'intensité maximale de l'absorbance, vers 360 nm.

Les concentrations en enzyme, isolée sous forme tétramérique ou dimérique, choisies (environ 80 μM, exprimées en sites), assurent une fixation stoechiométrique du cofacteur au tétramère. La valeur

du coefficient d'extinction molaire moyen par site est calculée à partir du maximum de la bande d'absorption à saturation des sites.

L'extinction de la bande d'absorption par des concentrations saturantes en G3P (1 mM final) ou 1,3-dPG (0,5 mM final) est réalisée d'une façon similaire à l'ajout du cofacteur NAD (Harrigan et Trentham, 1973).

VI) Dichroïsme circulaire.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un dichrographe Jobin-Yvon Spex CD6 à 25 °C dans une cellule en quartz de 0,1 cm de trajet optique. Le tampon utilisé était composé de K_2HPO_4 10 mM, pH 7. Pour les mesures, la concentration des échantillons était de 1,7 μM (exprimé en sites) pour le type sauvage et les mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus,* isolés sous forme dimérique ou tétramérique. Pour chaque mesure, un minimum de 5 spectres (de 190 nm à 260 nm) a été enregistré puis moyenné, le signal correspondant à la solution de référence étant soustrait. Les mesures sont alors converties dans un premier temps en delta epsilon ($\Delta\varepsilon$) puis en ellipticité moyenne par résidu exprimée en deg.cm^2.dmol^{-1} à 222 nm ($[\Theta]_{222}$) par la relation :

$$[\Theta]_{222} = 3298 \times \Delta\varepsilon \quad \text{(Woody, 1985)}$$

La fraction hélicoïdale ($f_{H,obs}$) est déterminée à partir des mesures d'ellipticité à 222 nm $[\Theta]_{obs}$ par la relation :

$$f_{H,obs} = \frac{[\Theta]_{obs} - [\Theta]_U}{[\Theta]_H - [\Theta]_U}$$

où $[\Theta]_H$ et $[\Theta]_U$ représentent respectivement les signaux obtenus pour 100% ou 0% d'hélice α. $[\Theta]_H$ peut être estimée à différentes températures t (en °C) à partir de la relation :

$$[\Theta]_H = -40000 \times (1-2,5/n) \text{ deg.cm}^2\text{.dmol}^{-1} + 100 \times t$$

où n est le nombre de résidus (Chakrabartty *et al*, 1991 ; Scholtz *et al*, 1991). La valeur de $[\Theta]_U$ est calculée à partir de :

$$[\Theta]_U = +640-45 \times t.$$

VII) Techniques d'étude de la réactivité de la Cys149 dans la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

Dans une précédente étude (Talfournier *et al*, 1998), l'utilisation de sondes chimiques cinétiques telles que l'IAM et le 2,2'dipyridyl disulfure (2PDS) avait permis de déterminer le pKapp et la réactivité de la Cys149 pour l'enzyme de type sauvage et certains mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

Les cinétiques de réaction des différentes GAPDHs avec le 2PDS sont suivies en cinétique de mélange rapide (Stopped-Flow). Toutes les réactions se déroulent à 25°C, à une force ionique constante de 0,15 dans des conditions de pseudo-premier ordre où la concentration de disulfure est largement supérieure à la concentration de GAPDH. Le disulfure et les enzymes sont en solution dans le tampon A (acide acétique 30 mM, imidazole 30 mM, Tris/HCl 120 mM, EDTA 0,2 mM à une force ionique de 0,15). La première seringue est remplie avec l'enzyme et la seconde l'est avec le 2PDS. La réaction avec le 2PDS est suivie à 343 nm avec 2 μM de GAPDH et 200μM de 2PDS. Le relargage du 2-thione pyridine est quantifié en utilisant $\Delta\varepsilon = 8080\ M^{-1}.cm^{-1}$.

Les cinétiques ont été réalisées sur l'appareil de Stopped-Flow Biologic SFM3 et les données analysées par régression non linéaire avec le programme Biokine. Les constantes de vitesse de premier ordre (k_{obs}) sont obtenues en ajustant l'absorbance (A) en fonction du temps t à l'équation d'une monoexponentielle :

$$A = P_1 e^{-P_2 t} + P_3 t + P_4$$

où $P_1 = A_\infty - A_0$, $P_2 = k_{obs}$, P_3 la pente de la composante d'ordre 0 en s^{-1} et P_4 la valeur extrapolée de l'ordonnée à l'origine. Les constantes de vitesse de second ordre sont calculées à l'aide de la relation $k_2 = \frac{k_{obs}}{[disulfure]}$. Les valeurs des constantes de vitesse de second ordre (k_S^-, k_{IP}) et des pKa (pK_a Cys et pK_a His) sont obtenues en ajustant k_2 en fonction du pH à l'équation à :

un seul pK_a : $k_2 = k_{S^-} \times \left(\frac{1}{1+10^{(pKaCys-pH)}} \right)$

deux pK_a : $k_2 = k_{IP} \times \left(\frac{1}{1+10^{(pKaCys-pH)}} \right) \times \left(\frac{1}{1+10^{(pH-pKaHis)}} \right) + k_{S^-} \times \left(\frac{1}{1+10^{(pKaHis-pH)}} \right)$

avec k_S^- et k_{IP} représentant respectivement la constante de vitesse de second ordre de l'enzyme sous la forme $Cys^-149/His176$ et Cys^-149/His^+176.

VIII) Spectres de calorimétrie différentielle (DSC pour Differential Scanning Calorimetry).

L'ensemble de ces mesures a été réalisé par le Pr Muronetz et ses collaborateurs de l'Université d'Etat de Moscou.

Les spectres de calorimétrie différentielle ont été réalisés avec un calorimètre adiabatique DASM-4 (Biopribor, Pouschino, Russie) avec des cellules de 0,47 ml, à une vitesse de 1°C par minute et à une concentration de protéine de 1 mg/ml. La ligne de base de l'instrument, enregistrée lorsque les deux cellules sont remplies de tampon, est soustraite des valeurs expérimentales pour obtenir les courbes de capacité calorifique. La température maximale du pic de transition thermique (t_{max}) et les enthalpies calorimétriques (ΔH^{cal}) sont déterminées à l'aide du programme Microcal Origin 4.1. En raison de l'absence d'équilibre dans le processus de dénaturation thermique, la valeur de l'enthalpie van't Hoff ne peut pas être calculée. Cela ne permet pas le calcul du rapport $\Delta H^{cal}/\Delta H^{van't\ HOFF}$, qui est couramment utilisé pour évaluer le caractère coopératif d'une transition de dénaturation (Jaenicke, 1991). Le caractère coopératif des transitions de dénaturation est donc évalué par comparaison de la largeur à mi-hauteur des pics correspondants.

IX) Détermination de la constante d'équilibre de dissociation K_{diss} entre les formes tétramériques et dimériques d'un même mutant.

IX.1) Détermination de K_{diss} par mesure de l'activité enzymatique.

IX.1.1) Principe.

En considérant que seule la forme tétramérique du mutant en équilibre tétramère – dimère est active, on peut élaborer un modèle théorique :

$$T_{actif} \xleftrightarrow{K_{diss}} D_{inactif} \qquad (1)$$

où T_{actif} est le tétramère actif, $D_{inactif}$ le dimère inactif et K_{diss} la constante de dissociation.

$$K_{diss} = [D_{inactif}]^2 / [T_{actif}] \qquad (2)$$

$$[D_{inactif}] = E_0 - 2[T_{actif}] \qquad (3)$$

où E_0 est la concentration totale en dimère quand la dissociation est complète

$$Aspé = 2Aspé_{\max}\,[T_{actif}]/E_0 \qquad (4)$$

où *Aspé* est l'activité spécifique et $Aspé_{max}$ l'activité spécifique maximale.

$$Aspé = Aspé_{\max}\left[4E_0 + K_{diss} - \left(8E_0K_{diss} + K_{diss}{}^2\right)^{1/2}\right]/4E_0 \qquad (5)$$

Les valeurs expérimentales exprimant l'activité spécifique (*Aspé*) en fonction de la concentration en GAPDH (exprimée en dimére, E_0) sont ajustées à l'équation (5) et donnent accès aux valeurs de la constante de dissociation (K_{diss}) et de l'activité spécifique maximale ($Aspé_{max}$).

IX.1.2) Conditions expérimentales.

La forme tétramérique du mutant en équilibre tétramère – dimère, préalablement purifiée et stockée sous forme de précipité de sulfate d'ammonium, est dialysée 4 heures à 4°C dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8. Une gamme de concentration de tétramère est réalisée dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8, β-mercaptoéthanol 3 mM et elle est incubée 24 heures à 25°C de façon à être sûr que l'équilibre est atteint. Pour chaque concentration de tétramère, l'activité spécifique est mesurée en présence de NAD 2mM final et de G3P 2 mM final. Les valeurs de K_{diss} et de $Aspé_{max}$ sont ensuite calculées à l'aide de l'équation (5).

IX.2) Détermination de K_{diss} à l'aide de la Superose 12.

IX.2.1) Principe (Manning *et al*, 1996).

La constante de dissociation du tétramère K_{diss} est estimée comme suit :

$$\log(K_{diss}) = \log[T] - \log\frac{(\%T)}{0{,}04(100-\%T)^2}$$

avec [T] : concentration totale en enzyme (exprimée en tétramère)

%T : pourcentage de forme tétramérique à l'équilibre

Le tracé de $\log(\%T/0{,}04(100-\%T)^2$ en fonction de log[T] donne une droite de pente égale à 1. Quand $\log(\%T/0{,}04(100-\%T)^2 = 0$, $\log K_{diss}$ est égale à log[T].

IX.2.2) Conditions expérimentales.

La détermination de la constante de dissociation à l'aide de la Superose 12 est réalisée en parallèle de la détermination par mesure de l'activité spécifique et sur les mêmes échantillons de la gamme de concentration. Les conditions sont celles couramment utilisées pour la filtration sur gel, à savoir : élution à 0,2 ml/min et 25°C en présence de tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, KCl

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

RESULTATS

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

Partie A

I) Modélisation moléculaire - choix des mutations.

La GAPDH de *B. stearothermophilus* est un homotétramère qui présente une symétrie de groupe D2 (222), chaque sous-unité étant en contact avec ses trois partenaires (figure 10 page 71a). Comme déjà décrit dans la partie Introduction page 31, l'interface *P* (entre les sous-unités O et P et entre les sous-unités Q et R) est la plus étendue et celle où les interactions entre sous-unités sont les plus importantes. L'interface *R* (entre les sous-unités O et R et entre les sous-unités P et Q) est plus petite et les contacts entre sous-unités sont moins nombreux. L'interface *Q* (entre les sous-unités O et Q et entre les sous-unités P et R), quant à elle, est la plus petite et celle où les contacts entre sous-unités sont les moins nombreux. Les différences au niveau des interactions entre sous-unités font que le tétramère de la GAPDH peut en fait être décrit comme un « dimère de dimères ». Trois types de dimères sont possibles : les dimères où les sous-unités qui interagissent sont symétriques soit par rapport à l'axe *P*, l'axe *R* ou l'axe *Q* (figures 11, 12 et 13 pages 71b, c et d). La modélisation moléculaire de la surface accessible au solvant des trois dimères possibles, réalisée par E. Duée avec le programme CCP4 (CCP4, 1994) et par G. Mulliert avec le programme Brugel (Delhaise *et al*, 1984) en utilisant une sphère théorique de 1.4 Å de rayon, montre qu'un total de 222, 245, 286 et 300 résidus hydrophobes sont exposés en surface au contact du solvant, respectivement dans le tétramère sauvage, les dimères O-P, O-R et O-Q. En raison de la stabilité de l'interface *P* et du plus faible nombre de résidus hydrophobes exposés au solvant, le dimère O-P devrait être le plus stable et le plus facile à générer par ingénierie protéique.

Après un examen précis de la structure tridimensionnelle de la GAPDH de *B. stearothermophilus* (Skarzynski *et al*, 1987; Skarzynski et Wonacott, 1988), 8 résidus (sur un total de 42) qui établissent des liaisons hydrogène à travers les interfaces ont été sélectionnés en vue de générer un dimère O-P, à savoir Tyr46, Ser48, Arg52, Asn180, Asp186, Arg197, Glu276 et Asp282 (tableau 2 page 71e). Ces résidus ont plusieurs propriétés en commun. Premièrement, ils sont tous fortement conservés dans les GAPDH des différentes espèces, à l'exception du résidu Asn180. Deuxièmement, ils sont impliqués dans des liaisons hydrogène inter sous-unités stabilisatrices et enfin, ils sont tous localisés dans des boucles. Les résidus Tyr46, Ser48 et Arg52 sont respectivement les premier, troisième et septième résidus, sur un total de 11 résidus, de la boucle qui suit l'hélice α_c, dans le domaine du cofacteur (figure 14 page 71f). Les cinq autres résidus sont situés dans des boucles appartenant au domaine catalytique. Les résidus Asn180, Asp186 et Arg197 sont situés dans la boucle S, qui s'étend du résidu Thr179 au résidu Glu201, respectivement en deuxième, huitième et dix huitième position. Les résidus Glu276 et Asp282 sont situés dans la boucle qui suit le feuillet β_5 respectivement en première et septième position sur un

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

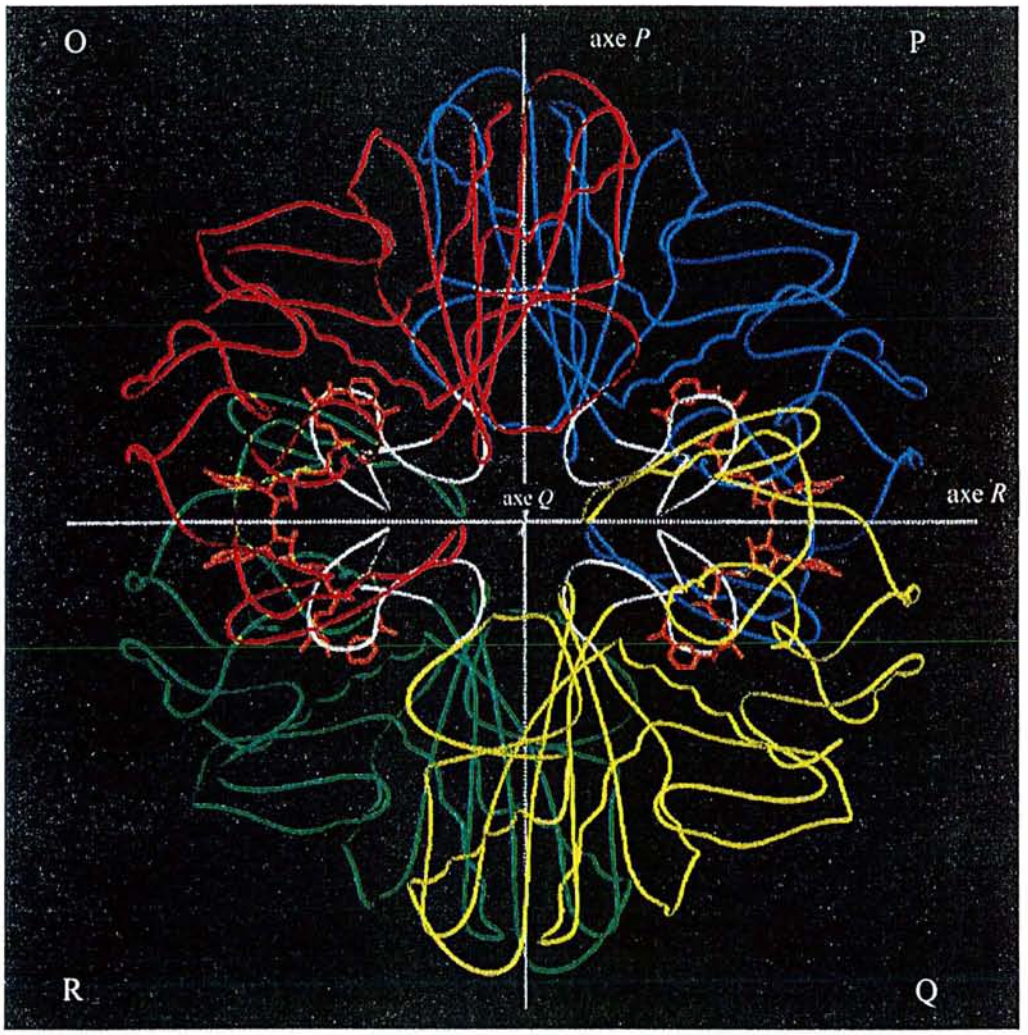


Figure 10 : Arrangement spatial des quatre sous-unités de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, sous la forme holoenzyme (Skarzynski *et al*, 1987).

Seule la chaîne principale et les molécules de NAD (en orange) sont représentées. Chaque sous-unité est colorée suivant la convention définie par Rossmann *et al* (1973). La boucle S de chaque sous-unité est colorée en blanc. Les lettres O, P, Q et R désignent chaque sous-unité et les axes *P*, *Q*, et *R* sont indiqués en lignes continues. Les sous-unités symétriques par rapport à l'axe *R* (O et R, P et Q) interagissent par l'intermédiaire du domaine de fixation du NAD et de la boucle S.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

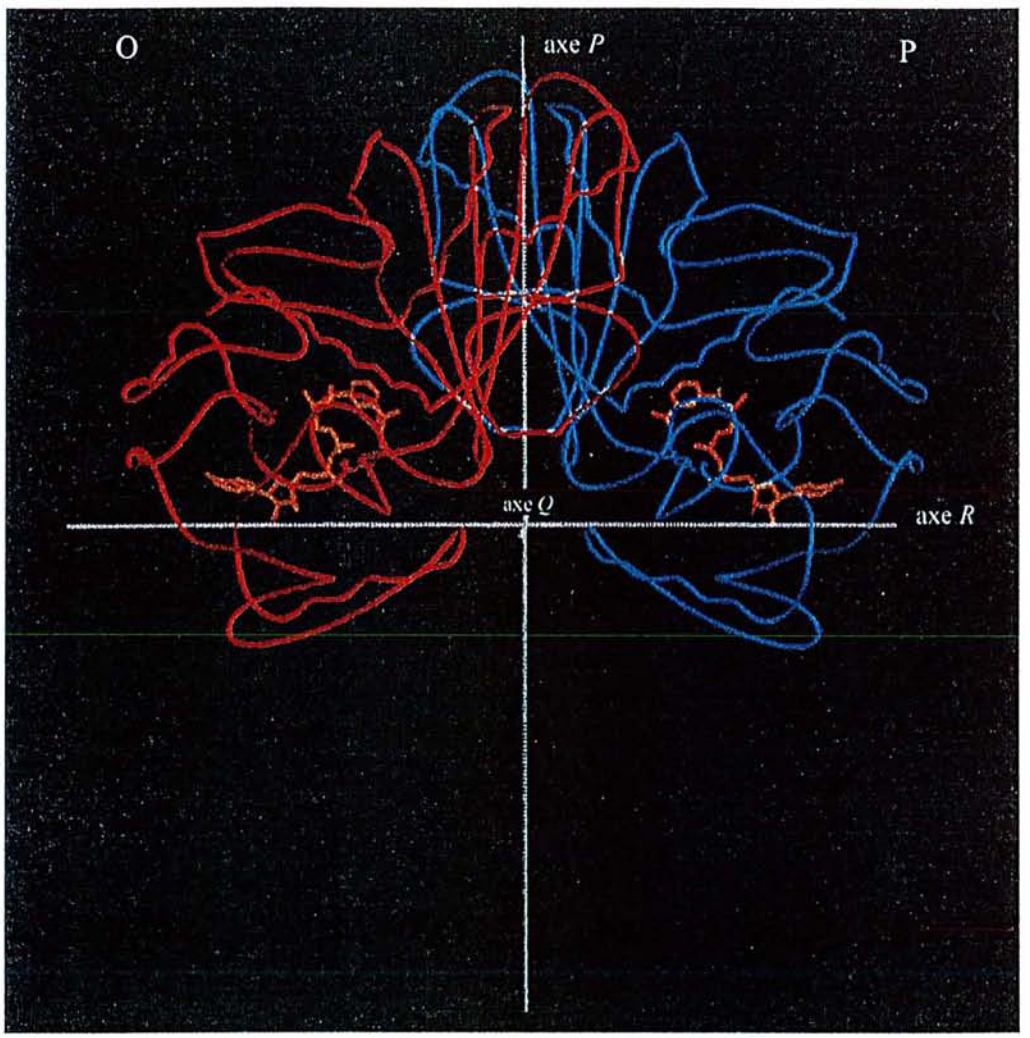


Figure 11 : Représentation schématique de la structure du dimère O-P de la GAPDH de *B. stearothermophilus* en présence de NAD.

Les coordonnées sont extraites du fichier PDB 1gd1 (Skarzynski *et al*, 1987). Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991). Le monomère O est indiqué en rouge, le monomère P en bleu et le NAD en orange. Les axes de symétrie *P* et *R* sont indiqués en lignes continues, l'axe *Q* étant perpendiculaire au plan formé par ces derniers.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

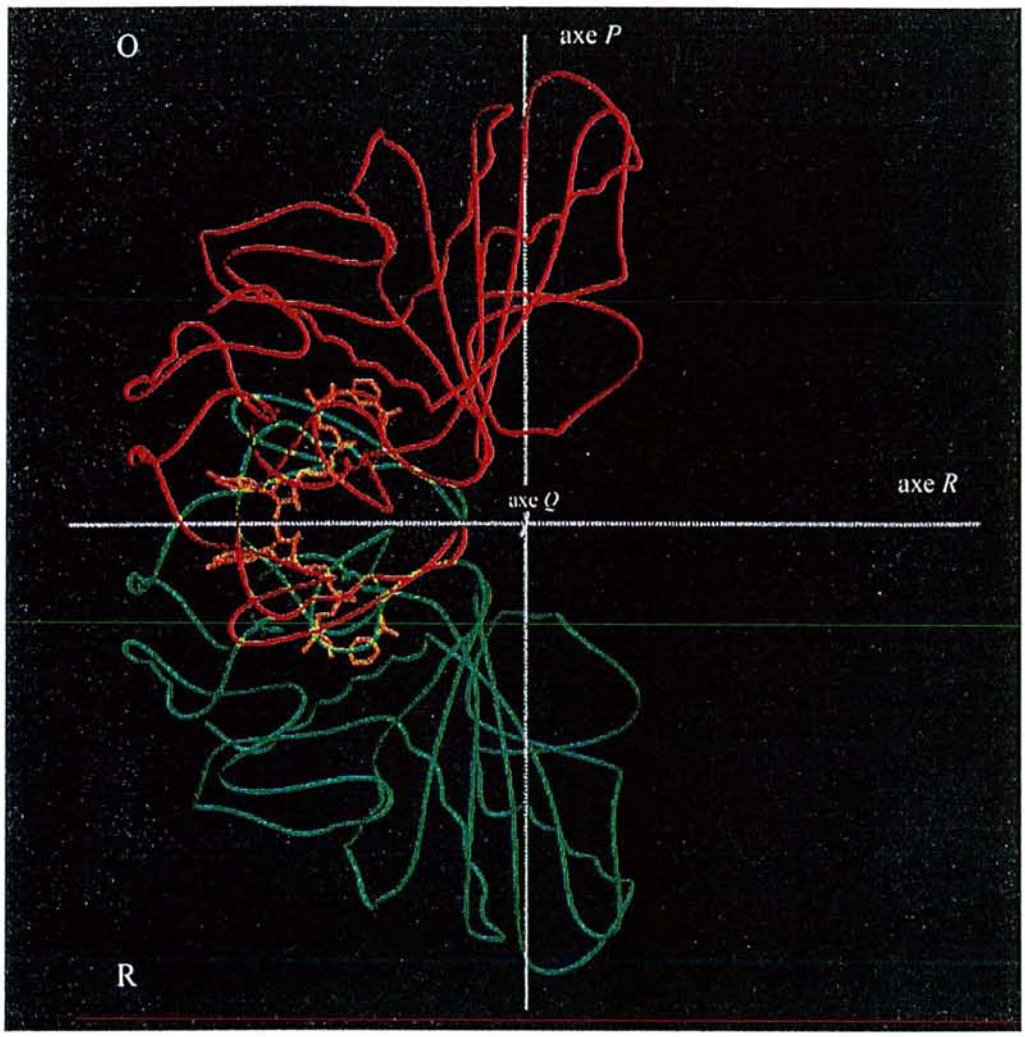


Figure 12 : Représentation schématique de la structure du dimère O-R de la GAPDH de *B. stearothermophilus* en présence de NAD.
Les coordonnées sont extraites du fichier PDB 1gd1 (Skarzynski *et al*, 1987). Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991). Le monomère O est indiqué en rouge, le monomère R en vert et le NAD en orange. Les axes de symétrie *P* et *R* sont indiqués en lignes continues, l'axe *Q* étant perpendiculaire au plan formé par ces derniers.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

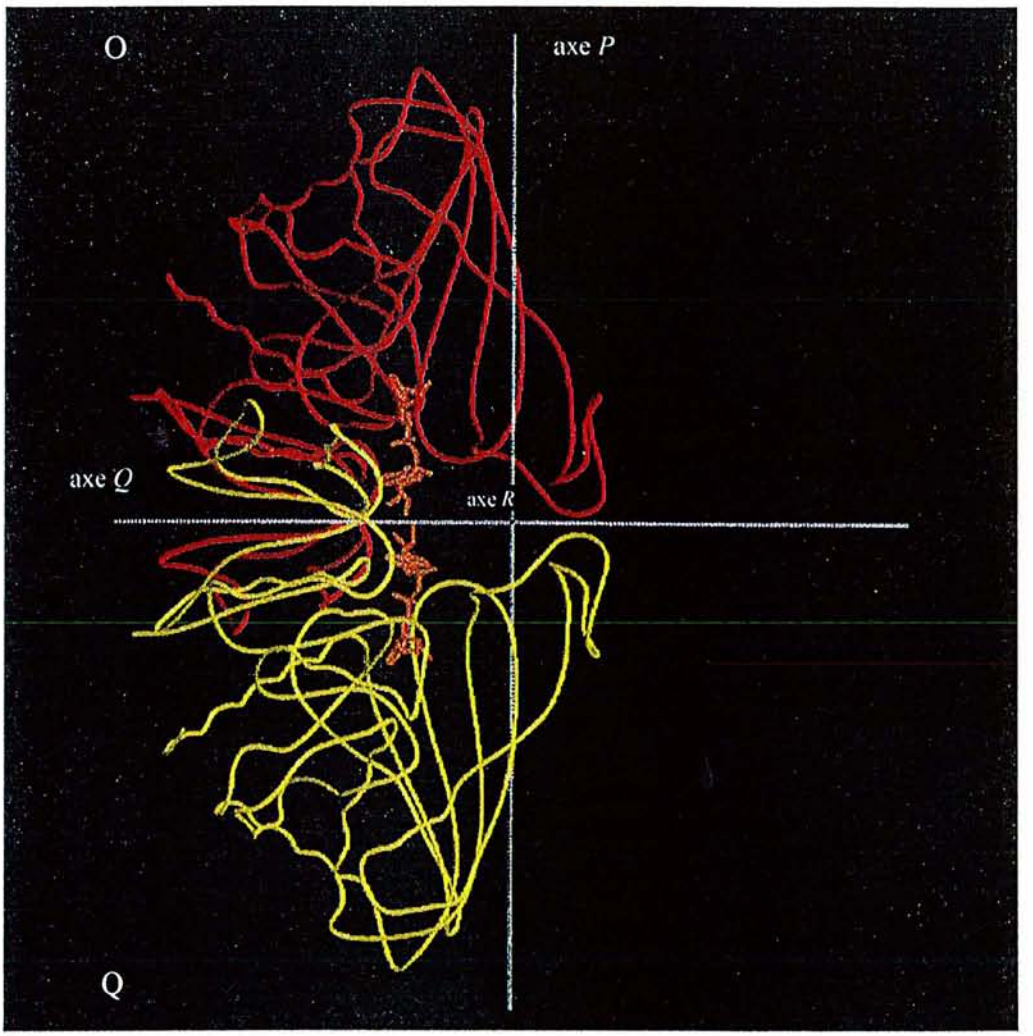


Figure 13 : Représentation schématique de la structure du dimère O-Q de la GAPDH de *B. stearothermophilus* en présence de NAD.
Les coordonnées sont extraites du fichier PDB 1gd1 (Skarzynski *et al*, 1987). Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991). Le monomère O est indiqué en rouge, le monomère Q en jaune et le NAD en orange. Les axes de symétrie *P* et *Q* sont indiqués en lignes continues, l'axe *R* étant perpendiculaire au plan formé par ces derniers.

		Distance Å	
Interface *P*		O-P	Q-R
Arg 169 NH2	Glu245 OE1	2,74	3,12
Arg 169 NE	Glu 245 OE2	2,98	2,72
Thr 173 OG1	Asp 241 OD2	2,58	2,52
Thr 173 OG1	Lys 306 NZ	2,78	2,75
Arg 194 NH2	Asp 293 OD1	2,81	2,80
Arg 194 NH1	Leu 278 O	2,74	2,49
Arg 194 NH1	Asp 293 OD2	2,93	3,14
Arg 197 NH2	**Asp 282 OD2**	2,96	2,85
Arg 197 NH1	**Asp 282 OD1**	2,66	2,65
Glu 201 OE1	Arg 281 NH2	2,84	-†
Glu 201 O	Arg 281 NE	2,96	-†
Ser 202 OG	Arg 281 N	3,19	3,12
Ile 203 N	Ser 280 OG	2,86	3,05
Asp 241 OD2	Thr 173 OG1	2,63	2,76
Glu 245 OE2	Arg 169 NE	2,79	2,79
Glu 245 OE1	Arg 169 NH2	2,66	2,88
Leu 278 O	Arg 194 NH1	2,84	2,71
Ser 280 OG	Ile 202 N	3,02	2,77
Arg 281 N	Ser 202 OG	3,11	3,29
Arg 281 NH2	Glu 201 OE1	-	2,97†
Arg 281 NE	Glu 201 O	-	2,85†
Asp 282 OD2	**Arg 197 NH2**	2,74	2,65
Asp 282 OD1	**Arg 197 NH1**	2,70	2,61
Asp 293 OD2	Arg 194 NH1	2,94	2,86
Asp 293 OD1	Arg 194 NH2	2,79	2,73
Lys 306 NZ	Thr 173 OG1	2,83	3,00
Interface *R*		O-R	P-Q
Arg 13 NH2	**Asp 186 O**	2,84	2,90
Ser 48 N	**Asp 186 OD2**	3,03	3,04
Ser 48 OG	**Asp 186 OD1**	2,72	2,79
Asn 180 ND2	Leu 185 O	2,93	3,05
Asn 180 OD1	Leu 185 N	3,01	3,02
Leu 185 N	**Asn 180 OD1**	3,09	2,97
Leu 185 O	**Asn 180 ND2**	3,18	2,87
Asp 186 OD2	**Ser 48 N**	2,86	2,98
Asp 186 OD1	**Ser 48 OG**	2,66	2,72
Asp 186 O	Arg 13 NH2	2,99	2,77
Interface *Q*		O-Q	P-R
Arg 52 NH2	**Asp 282 O**	3,15	3,09
Arg 52 NE	**Asp 282 O**	3,20	3,14
Glu 276 OE2	Tyr 46 OH	2,85	2,80§
Tyr 46 OH	**Glu 276 OE2**	3,04	3,05
Asp 282 O	**Arg 52 NH2**	2,79	3,05
Asp 282 O	**Arg 52 NE**	2,90	2,84

† Arg 281 asymétrique
§ Densité électronique faible pour le Glu 276(O)

Tableau 2 :
Liaisons hydrogène inter sous-unités de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.
D'après Skarzynski *et al*, 1987.
Les résidus sélectionnés dans le but de déstabiliser les interfaces du tétramère sont indiqués en gras.

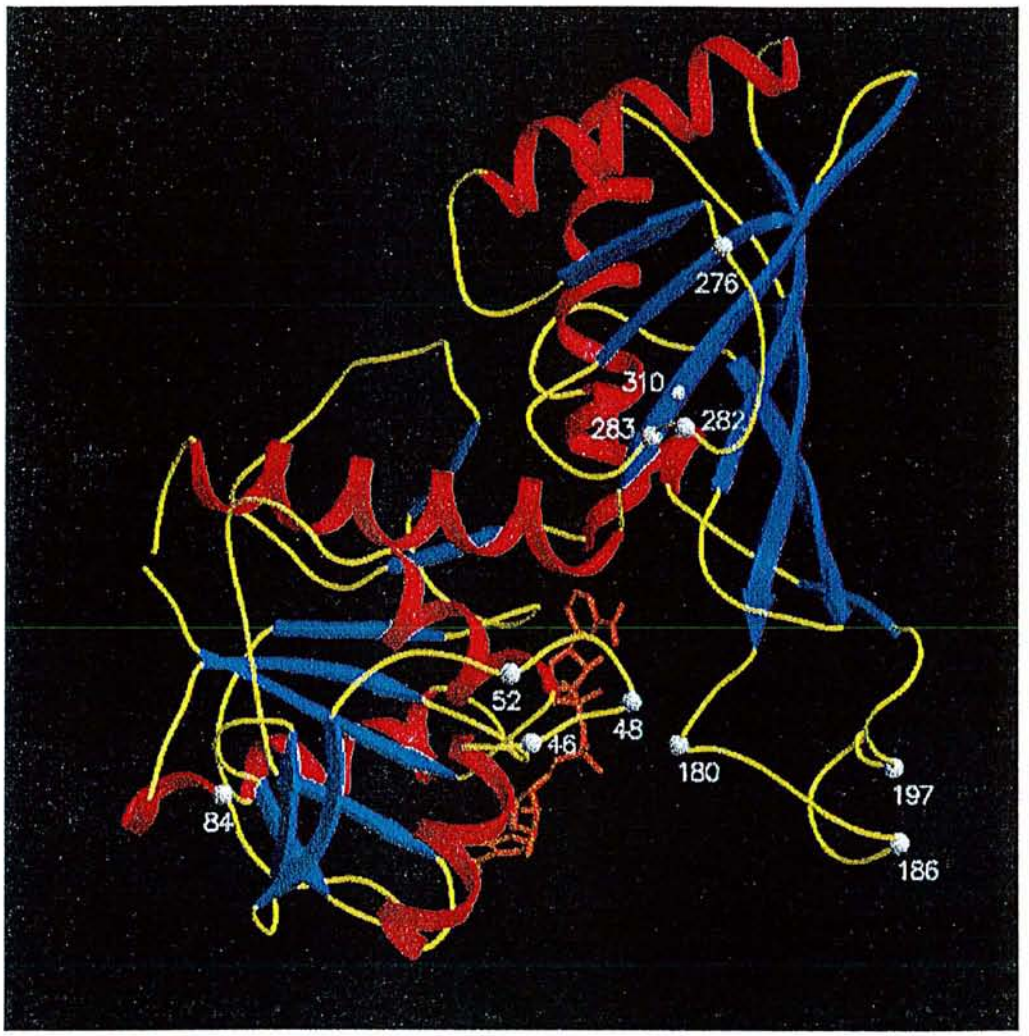


Figure 14 : Modèle en « rubans-flèches » de la structure du monomère O de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous forme holo.

Les coordonnées sont extraites du fichier PDB 1gd1 (Skarzynski *et al*, 1987). Ce schéma a été réalisé grâce au programme Molscript (Kraulis, 1991). Les résidus choisis pour déstabiliser le tétramère sont représentés par une sphère blanche.

total de 14 résidus. Tous les résidus mentionnés ont été remplacés par des résidus glycine, les simulations réalisées par G. Mulliert à l'aide du logiciel de modélisation moléculaire Brugel (Delhaise *et al*, 1984) suggérant que le résidu glycine était le plus adapté pour remplacer ces acides aminés sans fortement perturber la conformation des boucles dans lesquelles ils sont positionnés.

Dans le cadre d'une collaboration avec G. Strambini (Institut de Biophysique-CNR, Pise) dont le but était de démontrer que la proximité spatiale du noyau phénolique du résidu Tyr283 de la GAPDH de *B. stearothermophilus* pouvait contribuer à l'extinction de phosphorescence du résidu Trp310, le résidu Tyr283 avait été remplacé par un résidu valine (Strambini *et al*, 1998). Afin de pouvoir étudier le rôle du résidu Tyr283 dans l'extinction de phosphorescence du résidu Trp310, le second résidu tryptophane de la GAPDH de *B. stearothermophilus* Trp84 avait été remplacé par un résidu phénylalanine conduisant ainsi aux GAPDH mutées W84F et (W84F-Y283V). Comme le résidu Tyr283 est situé dans la même boucle que le résidu Asp282, en l'occurrence la boucle qui suit le feuillet β_5, et que la GAPDH mutée D282G est isolée sous deux formes, dimère et tétramère en équilibre (voir tableau 3 page 75a), il était possible que la GAPDH mutée Y283V ne soit pas isolée sous forme strictement tétramérique pouvant ainsi remettre en cause la validité des interprétations des résultats d'extinction de phosphorescence obtenus. Cela explique donc notre intérêt à caractériser l'état oligomérique des mutants Y283V et (W84F-Y283V) ainsi que celui des mutants W84F et W310F. Aucun des trois résidus sélectionnés, à savoir Trp84, Tyr283 et Trp310, ne forme de liaison hydrogène intra ou inter sous-unités par l'intermédiaire de sa chaîne principale ou de sa chaîne latérale. Les noyaux aromatiques des résidus Tyr283 et Trp310 appartenant au domaine catalytique d'un même monomère interagissent spécifiquement (Strambini *et al*, 1998). Les résidus Trp84 et Trp310 sont très conservés dans les GAPDH des différentes espèces à l'inverse du résidu Tyr283. Seul le résidu Tyr283 est situé dans une boucle, tandis que le résidu Trp84 est le premier acide aminé de l'hélice α_D (qui s'étend du résidu Trp84 au résidu Ile87) et le résidu Trp310 est localisé dans le feuillet β_7 (qui s'étend de l'aminoacide 305 à l'aminoacide 312).

II) Production et purification des mutants.

Tous les mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* ont été obtenus par mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel (Kunkel, 1985 ; Kunkel *et al*, 1991) à partir du plasmide pSKBstII (voir partie Matériel et Méthodes page 39a) à l'exception des deux simples mutants R197G et D282G et du triple mutant (N180G-D186G-E276G). Les deux simples mutants ont été

obtenus par mutagenèse dirigée selon la méthode de la réaction de polymérisation en chaîne tandis que le triple mutant a été obtenu selon la méthode de Deng et Nickoloff (Deng et Nickoloff, 1992).

La production des enzymes mutées a été réalisée en erlenmeyers en utilisant la souche d'*E. coli* HB101 selon un protocole identique à celui suivi pour le type sauvage (voir partie Matériel et Méthodes, page 51). Le taux d'expression des enzymes mutées est équivalent à celui de l'enzyme de type sauvage. Durant la purification et jusqu'à l'étape de chromatographie d'exclusion, le comportement des GAPDH mutées est similaire à celui de l'enzyme de type sauvage. La GAPDH endogène d'*E. coli* est, quant à elle, en partie éliminée lors de cette étape de filtration sur gel. Durant l'étape suivante de chromatographie échangeuse d'anions, les formes dimériques et tétramériques des enzymes mutées produites sous une seule forme oligomérique ou sous deux formes, dimère et tétramère en équilibre, sont éluées aux alentours de respectivement 150 mM et 250 mM de KCl. Enfin, durant la dernière étape de chromatographie hydrophobe, les formes dimériques et tétramériques des enzymes mutées produites sous une seule forme oligomérique ou sous deux formes, dimère et tétramère en équilibre, sont éluées respectivement à 200 mM et 600 mM en sulfate d'ammonium. La GAPDH endogène d'*E. coli*, qui est éluée à 400 mM en sulfate d'ammonium, est totalement éliminée à la fin de cette étape. Tous les mutants générés sont isolés sous forme apoenzyme à l'exception des mutants Y46G, S48G, R52G, W84F, E276G et des formes tétramériques des mutants Y283V et (W84F-Y283V) en équilibre dimère–tétramère. Les rendements après purification sont d'environ 50 mg d'enzyme pure pour un litre de culture (figure 15 page 73a).

Dans le cas des formes dimériques des enzymes mutées produites sous forme strictement dimérique ou sous les deux formes dimère et tétramère en équilibre, l'analyse par SDS-PAGE du surnageant juste après sonication a permis de mettre en évidence la présence d'une bande très majoritaire correspondant au monomère de la GAPDH mutée de masse moléculaire apparente 36 kDa et de deux autres bandes minoritaires correspondant à des polypeptides de masses moléculaires apparentes d'environ 21 et 14 kDa. L'incubation à température ambiante du surnageant de sonication montre une évolution du profil de migration avec une disparition progressive de la bande correspondant au monomère de la GAPDH mutée de masse moléculaire apparente 36 kDa et l'augmentation concomittante de l'intensité des deux bandes correspondant aux polypeptides de masses moléculaires apparentes d'environ 21 et 14 kDa (résultats non montrés). Ces trois bandes donnent une réponse positive lors de l'immunodétection avec des anticorps polyclonaux anti-GAPDH de *B. stearothermophilus* (résultats non montrés). L'analyse par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes réalisée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (Dr. A. Van Dorsselaer, CNRS-UMR 7509, Strasbourg) a

A

Etape de la purification	DO_{280}/DO_{260}	Protéine totale (en DO_{280})	Activité totale ($\mu moles.min^{-1}$)
Sson [b]	0,54	2002	1001
S66% [c]	0,55	769	538
C92% [d]	0,80	255	510
ACA34 [e]	1,17	100	470
Q-Sépharose [f]	1,59	77	3,1
Phényl Sépharose [g]	1,89	53	0

B

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

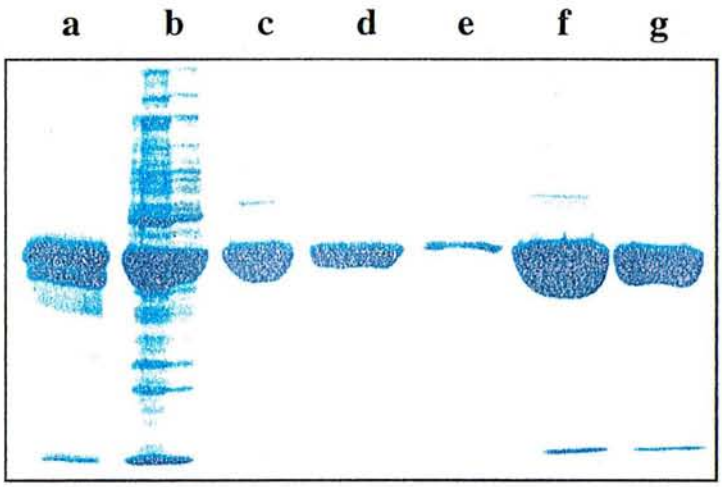


Figure 15 : Analyse des étapes de purification du mutant (Y46G-R52G) la GAPDH de *B. stearothermophilus*, isolé sous forme strictement dimérique.

A) Rendements obtenus pour une culture de 1 l en erlen. L'activité totale NAD dépendante a été déterminée à 25°C dans le tampon Ferdinand (triéthanolamine 40 mM, KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0,2 mM, pH 9,2 ; Ferdinand, 1964) en présence de NAD 1 mM final et de G3P 1 mM final et correspond à l'activité de la GAPDH d'*E. coli* endogène, la GAPDH dimérique ne possédant pas d'activité décelable. Les lettres situées en exposant font référence à la légende de la partie B.

B) Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes révélé par coloration au bleu de Coomassie. **a :** Témoin GAPDH de *B. stearothermophilus* (haut), et *E. coli* (bas), **b :** surnageant de sonication (50 mDO) ; **c :** surnageant de précipitation à 66% de saturation en sulfate d'ammonium (10 mDO) ; **d :** culot de précipitation à 92% de saturation en sulfate d'ammonium repris dans un volume minimum de tampon de sonication (10 mDO) ; **e :** solution protéique après filtration sur gel ACA34 (2 mDO) ; **f :** solution protéique après chromatographie échangeuse d'anions (5 mDO) ; **g :** solution protéique après chromatographie hydrophobe (5 mDO). Les quantités de protéines déposées sur gel ont été estimées par la DO à 280 nm et sont indiquées entre parenthèses.

permis de déterminer la masse moléculaire de chacune des trois bandes et le site de clivage a été identifié à l'aide du logiciel GCG version 9.0, Unix. Dans tous les cas, il se situe entre les résidus Arg195 et Ala196 de la boucle S. Les masses théoriques, qui sont d'environ 21 kDa pour le polypeptide Val1–Arg195 et d'environ 14 kDa pour le polypeptide Ala196-Leu333, suivant les mutations, sont en accord avec celles trouvées expérimentalement. L'addition de phényl méthyl sulfonyl fluorure (PMSF), qui est décrit comme un inhibiteur efficace des protéases à sérine, bloque la disparition de la bande correspondant au monomère de la GAPDH mutée et l'augmentation de l'intensité des deux bandes correspondant aux polypeptides de masses moléculaires apparentes d'environ 21 et 14 kDa. Ceci suggère fortement que la formation des bandes correspondant aux polypeptides de masses moléculaires d'environ 21 et 14 kDa est due à une protéolyse par une protéase à sérine. L'addition de PMSF dès l'étape de sonication conduit à une absence presque totale des bandes correspondant aux polypeptides de masses moléculaires d'environ 21 et 14 kDa, permettant ainsi d'obtenir une enzyme homogène en fin de purification. Ceci montre que la protéolyse n'a pas lieu in vivo. La nature de la protéase à sérine intervenant reste à déterminer. Le fait qu'aucune protéolyse n'intervienne in vivo suggère que la protéase n'est pas d'origine cytoplasmique. Vu que le site de coupure est situé entre les résidus Arg195 et Ala196, elle devrait être de type trypsine. Une manière de le démontrer serait de créer un mutant existant sous forme dimérique où le résidu Arg195 serait remplacé par un résidu non basique. L'accessibilité du site de clivage à la protéase doit être la conséquence de la forme dimérique. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales, les formes tétramériques présentent sur SDS-PAGE une bande unique correspondant au monomère de la GAPDH mutée de masse moléculaire apparente 36 kDa, qui n'évolue pas après incubation à température ambiante. Dans le cas de l'enzyme de type sauvage et des formes tétramériques des enzymes mutées, aucune protéolyse n'a lieu car, en se basant sur la structure cristallographique à haute résolution de l'enzyme de type sauvage, le site de clivage n'est pas accessible à la protéase. Dans le cas des formes dimériques des enzymes mutées isolées sous forme strictement dimérique ou sous les deux formes dimère et tétramère en équilibre, et en absence de PMSF, la protéolyse a lieu, indiquant que le site de clivage et notamment le sous-site S_1 occupé par le résidu Arg195 est accessible à la protéase de type trypsine et que le fragment polypeptidique correspondant se trouve dans une conformation étendue. L'existence sur SDS-PAGE de bandes issues de la protéolyse ne devrait pas permettre pas de distinguer le dimère O-P (c'est à dire le dimère où les sous-unités sont symétriques par rapport à l'axe *P*) des autres types de dimères O-R et O-Q, car le site de clivage devrait être accessible à la protéase dans les 3 types de dimères.

NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

III) Caractérisation de l'état oligomérique.

Tous les éléments de structure secondaire présents dans l'enzyme de type sauvage sont retrouvés chez les enzymes mutées isolées sous forme soit strictement dimérique, soit strictement tétramérique, ou sous les deux formes, dimère et tétramère en équilibre, comme l'indique la similitude entre le spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain des enzymes mutées et celui de l'enzyme de type sauvage (courbes non montrées).

Dans nos conditions expérimentales, les enzymes mutées isolées sous forme strictement tétramérique conservent le même état oligomérique jusqu'à une dilution de 0.1 μM en oligomère. Un coefficient de partition (K_{av}) de 0,38 correspondant à une masse moléculaire apparente de 129 +/- 11 kDa, proche de la valeur théorique de 144 kDa, a été déterminé par chromatographie d'exclusion avec la colonne Superose 12 pour les enzymes sauvage et mutées (figure 2 de l'article page 88). Un coefficient de partition (K_{av}) de 0,45 correspondant à une masse moléculaire apparente de 72 +/- 4 kDa a été déterminé pour les enzymes mutées isolées sous forme strictement dimérique. L'état oligomérique des enzymes mutées isolées sous forme strictement dimérique reste inchangé jusqu'à une concentration de 350 μM de dimère. Les expériences d'ultracentrifugation en gradient de saccharose confirment les résultats obtenus par chromatographie d'exclusion. Des coefficients de sédimentation de 4,25 $S^0_{20,w}$ et 7,96 $S^0_{20,w}$ ont été obtenus respectivement pour les enzymes mutées isolées sous forme strictement dimérique et sous forme strictement tétramérique (tableau 3 page 75a). Ces valeurs correspondent aux données bibliographiques déjà parues pour la GAPDH de muscle de lapin (Constantinides et Deal, 1969, 1970). L'enzyme de type sauvage sous forme apo et holo a été utilisée comme témoin. L'addition du cofacteur ou de l'un des substrats ne modifie pas l'état oligomérique des enzymes mutées isolées sous forme strictement dimérique : ces enzymes conservent le même état oligomérique en présence d'un excès de 50 fois de NAD ou de phosphate inorganique (par rapport au nombre de sous-unités).

Les valeurs des coefficients de sédimentation déterminés par ultracentrifugation analytique (tableau 3 page 75a) sont en accord avec ceux déterminés par ultracentrifugation en gradient de saccharose de 5 à 20%. La GAPDH sauvage de *B. stearothermophilus* et les GAPDH mutées isolées sous forme dimérique présentent des profils de migration différents sur gel de polyacrylamide en conditions natives (figure 16 page 75b).

L'état oligomérique de l'enzyme de type sauvage et des formes dimériques des enzymes mutées (N180G-E276G) et Y283V produites sous forme d'un équilibre dimère-tétramère a été confirmé par spectrométrie de masse électrospray en conditions natives au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (Dr A. Van Dorsselaer, CNRS-UMR 7509, Strasbourg).

Mutation	Etat oligomérique	Coefficient de sédimentation $S^0_{20,w}$ (S)
Sauvage	T	8[a] / 7,06[b] / 6,77[c]
Y46G	T	8[a]
S48G	T	8[a]
R52G	T	ND
(Y46G-S48G)	D	4,25[a]
(Y46G-R52G)	D	4,10[c]
(S48G-R52G)	eq D⇔T	ND
N180G	T	ND
D186G	T	8[a]
E276G	T	8[a]
(N180G-D186G)	T	ND
(N180G-E276G)	eq D⇔T	T : 7,03[a] / 6,82[c] D : 4,52[a] / 4,07[c]
(D186G-E276G)	D	4,25[a]
(N180G-D186G-E276G)	D	4,25[a]
R197G	eq D⇔T	ND
D282G	eq D⇔T	T : ND[c] D : 3,4[c]
W84F	T	ND
Y283V	eq D⇔T	ND
(W84F-Y283V)	eq D⇔T	T : 6,82[c] D : ND[c]
W310F	T	ND

Tableau 3 : Etat oligomérique des différents mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.
L'état oligomérique de l'ensemble des différentes enzymes mutées a été déterminé par chromatographie d'exclusion avec la colonne Superose 12. Pour une partie d'entre elles, le coefficient de sédimentation a été déterminé soit : ([a]) par ultracentrifugation en gradient de saccharose de 5 à 20% soit par ultracentrifugation analytique ([b]) au Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurale, UPR CNRS 9063 (Dr Ladjimi, Gif/Yvette) en présence de tampon Tris/HCl 50 mM, KCl 150 mM, pH 8. ([c]) à l'Université d'Etat de Moscou (Pr Muronetz) en présence de tampon KH_2PO_4 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7. Les différents symboles T, D et eq D⇔T désignent respectivement les espèces tétramérique, dimérique et en équilibre dimère-tétramère. L'erreur sur les mesures des coefficients de sédimentation est inférieure à 10%. ND : non déterminé.

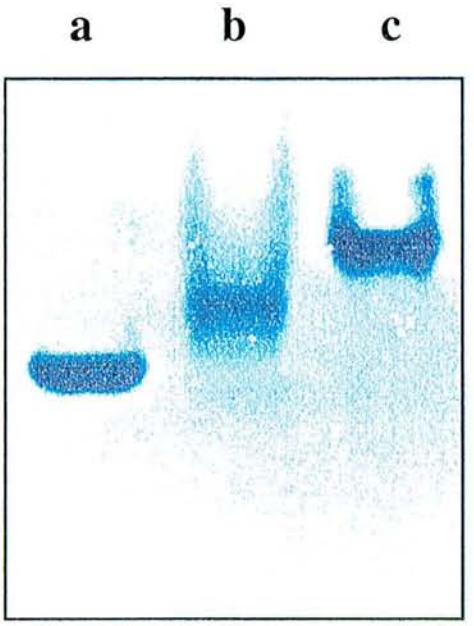


Figure 16 : Gel de polyacrylamide en conditions natives révélé par coloration au bleu de Coomassie.
(a) : GAPDH sauvage de *B. stearothermophilus* (5 mDO), pHi = 6,8.
(b) : mutant (D186G-E276G) de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, isolé sous forme strictement dimérique (5 mDO).
(c) : GAPDH sauvage d'*E. coli* (5 mDO), pHi = 7,1.
Les quantités de protéines déposées sur le gel de polyacrylamide à 10% ont été estimées par la DO à 280 nm et sont indiquées entre parenthèses. Les pHi indiqués sont les pHi théoriques calculés à l'aide du programme GCG version 9.0, Unix.

Les conditions d'ionisation électrospray sont optimisées pour préserver les associations non covalentes entre les sous-unités (ou avec le NAD) qui existent en solution, plutôt que pour obtenir une précision optimale dans la mesure de masse. Sur chaque spectre et pour chaque espèce (dimère et tétramère), on distingue plusieurs états de charges. Les échantillons sont préparés en conditions proches du pH physiologique, et la protéine se charge donc uniquement au niveau des sites protonables accessibles au solvant lorsqu'elle est repliée. Ceci explique que les états de charges soient beaucoup plus faibles qu'en conditions dénaturantes, et que l'on ait déplacé les pics vers les hauts m/z (voir partie Matériel et Méthodes page 58). Pour l'enzyme de type sauvage, tétramérique, trois états de charges sont présents : 26, 27 et 28 charges positives (respectivement notées 26^+, 27^+ et 28^+) aux environs de 5300 m/z. Pour les formes dimériques des enzymes mutées (N180G-E276G) et Y283V produites sous forme d'un équilibre dimère-tétramère, trois états de charge sont également retrouvés : 20, 19 et 18 charges positives (respectivement notées 20^+, 19^+ et 18^+) aux environs de respectivement 3590, 3778 et 3987 m/z (figure 17 page 76a).

L'erreur de 54 à 141 Da suivant les cas (tableau 4 page 76b) provient de la calibration de l'appareil qui est moins précise qu'en conditions dénaturantes. Ces masses, vu leur incertitude ne peuvent qu'être indicatives, mais elles permettent en tout cas de distinguer les pics appartenant aux formes dimériques et ceux appartenant aux formes tétramériques.

Parmi les acides aminés sélectionnés, aucune simple mutation ne conduit à une enzyme mutée qui sera produite sous forme strictement dimérique. La création d'une enzyme mutée qui sera produite sous forme strictement dimérique nécessite au moins la mutation de deux acides aminés. Différentes combinaisons ont été réalisées à l'intérieur des deux groupes de résidus définis (Asn180, Asp186 et Glu276) et (Tyr46, Ser48 et Arg52).

IV) Etude des propriétés enzymatiques.

IV.1) Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire.

Les paramètres cinétiques déterminés pour les enzymes mutées sont indiqués dans le tableau 5 page 76c avec ceux déterminés pour l'enzyme de type sauvage.

Les GAPDH mutées isolées sous forme strictement dimérique et les formes dimériques des GAPDH mutées isolées sous deux formes dimère et tétramère en équilibre sont inactives. Aucune

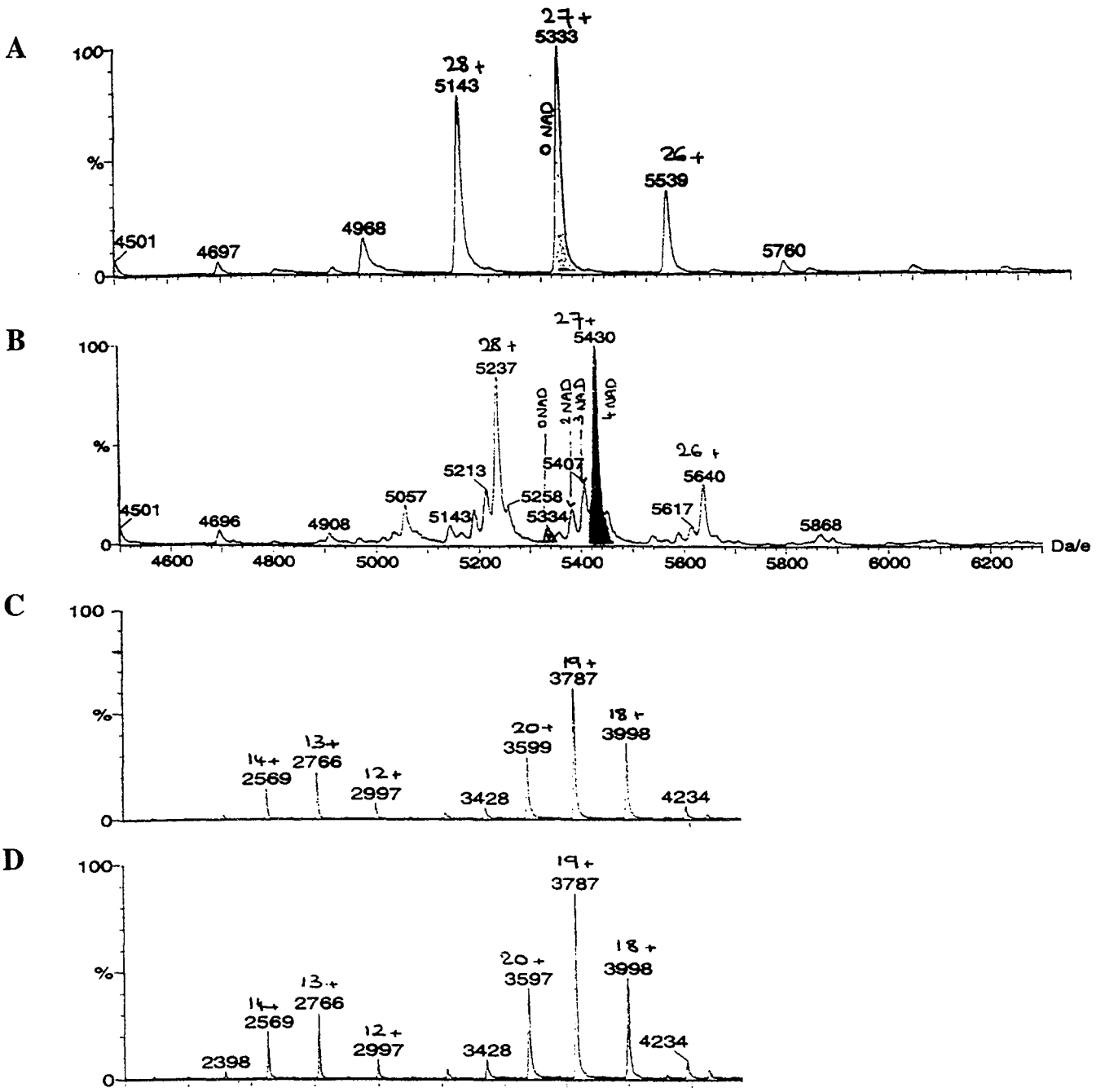


Figure 17 : Spectres de masse obtenus en électrospray en conditions natives.

La concentration en enzyme est de 40 µM en sous unités en tampon NH_4HCO_3 25 mM pH 7,8.

Pour la GAPDH sauvage de *B. stearothermophilus*, la gamme de m/z utilisée varie de 4500 à 6300 m/z. (**A**) : forme apoenzyme avec 3 états de charge 28+, 27+ et 26+ respectivement pour les pics situés à 5143 m/z, 5333 m/z et 5539 m/z. (**B**) : forme holoenzyme avec 3 états de charge 28+, 27+ et 26+ respectivement pour les pics situés à 5237 m/z, 5430 m/z et 5640 m/z.

Pour les formes dimériques apo des enzymes mutées en équilibre dimère-tétramère, la gamme de m/z utilisée varie de 2000 à 6000 m/z.

(**C**) : forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G). (**D**) : forme dimérique de la GAPDH mutée Y283V. Les états de charge 14+, 13+ et 12+ respectivement pour les pics situés à 2569 m/z, 2766 m/z et 2997 m/z correspondent au monomère généré à l'intérieur du spectromètre de masse (voir partie Matériel et Méthodes page 58). Les états de charge 20+, 19+ et 18+ respectivement, pour les pics situés à 3599 m/z, 3787 m/z et 3998 m/z correspondent au dimère.

Enzyme	Masses moléculaires calculées à partir des spectres (Da)	Masses Moléculaires théoriques (Da)	$\Delta M_{(mesurée - théorique)}$ (Da)
Sauvage, apo	143 885 +/- 3	143 776	106 à 112
Sauvage holo	146 484 +/- 2	146 428	54 à 58
(N180G-E276G) Dimère, apo	71 759 +/- 12	71 630	117 à 141
Y283V Dimère, apo	71 862 +/- 8	71 760	94 à 110

Tableau 4 : Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions natives.

La concentration en enzyme est d'environ 40 µM en sous unités dans le tampon NH_4HCO_3 25 mM pH 7,8. ΔM représente la différence entre les masses moléculaires mesurées et les masses moléculaires théoriques.

Mutation	NAD K_M (mM)	G3P K_M (mM)	Pi K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})
Sauvage	0,05	1,1	37	65
Y46G	0,23	0,8	8	87
S48G	0,04	1	7	20
R52G	0,20	1,2	3	60
(S48G-R52G) forme tétramérique	ND	ND	ND	0,1
W84F	0,11	1	40	62
N180G	1,74	0,3	39	115
D186G	0,33	1	18	2
E276G	0,07	0,9	7	72
(N180G-D186G)	0,35	1,7	45	0,3
(N180G-E276G) forme tétramérique	2,1	1,2	39	186
R197G forme tétramérique	ND	ND	ND	0,1
D282G forme tétramérique	ND	ND	ND	0,1
Y283V forme tétramérique	0,06	1,5	42	73
W310F	ND	ND	ND	51

Tableau 5 : Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire.

Les valeurs de k_{cat} et de K_M sont déterminées à concentration saturante des autres substrats (voir partie Matériel et Méthodes page 59) et exprimées par sous unité. Le pourcentage d'erreur pour chaque mesure est inférieur à 20%. ND : non déterminé.

activité enzymatique n'est décelable (k_{cat} inférieur à 10^{-3} s^{-1}) même en se plaçant dans les conditions de titration de site c'est à dire à forte concentration en dimère (jusqu'à 40 μM de dimère) et en concentrations supposées être saturantes en NAD et G3P.

L'activité spécifique des GAPDH mutées isolées sous forme strictement tétramérique varie quant à elle en fonction des mutations réalisées. Les GAPDH mutées Y46G, R52G, W84F, E276G et W310F possédent un k_{cat} comparable au k_{cat} de l'enzyme de type sauvage alors que le k_{cat} des enzymes mutées S48G et N180G est respectivement 3 fois inférieur et 2 fois supérieur à celui de l'enzyme de type sauvage. Par contre, la mutation du résidu Asp186 en glycine provoque une diminution du k_{cat} d'un facteur 32 et la double mutation des résidus Asn180 et Asp186 en glycine provoque une diminution du k_{cat} d'un facteur 216.

L'activité des formes tétramériques des GAPDH mutées isolées sous deux formes oligomériques dimère et tétramère en équilibre, varie elle aussi en fonction des mutations réalisées. Les formes tétramériques des GAPDH mutées (S48G-R52G), R197G et D282G présentent toutes un k_{cat} environ 650 fois inférieur à celui de l'enzyme de type sauvage. Par contre, le k_{cat} de la forme tétramérique des GAPDH mutées Y283V et (N180G-E276G) est respectivement comparable et trois fois supérieur au k_{cat} de l'enzyme de type sauvage. Seules les GAPDH mutées (N180G-E276G) et Y283V ont été étudiées car elles sont les seules à posséder une forme tétramérique fortement active. Ceci nous permettait d'étudier avec précision l'équilibre existant entre ces deux formes oligomériques par un suivi de l'activité (voir la partie B des Résultats).

Dans les dimères de type O-P, que l'on suppose avoir formés, les résidus Leu187 et Pro188 appartenant à la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *R* ne peuvent plus jouer le rôle d'antidéterminants structuraux, qui expliquent la fixation non-efficace du NADP sur le tétramère (Skarzynski *et al*, 1987, Corbier *et al*, 1990a, Didierjean *et al*, 1997). Nous avons donc entrepris de tester l'activité des formes dimériques des différentes GAPDH mutées, dans le sens phosphorylation oxydative avec le NADP comme cofacteur. Nous avons également entrepris de tester l'activité des formes dimériques des différentes GAPDH mutées dans le sens déphosphorylation réductive avec le NADH et le NADPH comme cofacteur. Aucune activité n'a été décelée (k_{cat} inférieur à 10^{-3} s^{-1}) y compris en se plaçant dans des conditions de titration de sites c'est à dire à forte concentration en dimère (jusqu'à 40 μM), et à fortes concentrations en cofacteur et en substrat G3P ou 1,3dPG.

IV.2) Détermination de l'étape limitante pour les formes tétramériques des GAPDH mutées.

Comme déjà indiqué dans la partie Introduction page 36, la phosphorylation oxydative du G3P en 1,3dPG par la GAPDH de type sauvage est un processus à deux étapes, avec une étape d'acylation rapide et une étape de phosphorolyse limitante, l'étape limitante à pH élevé étant vraisemblablement le relargage du cofacteur réduit NADH. En absence de phosphate inorganique, l'étape de déacylation devient très lente (environ 10^{-2} s^{-1}) ce qui peut permettre d'étudier plus aisément l'étape d'acylation. Dans ces conditions, l'analyse de l'étape d'acylation à pH basique avec un spectrophotomètre classique montre un saut de production de NADH proportionnel à la concentration d'enzyme (8 et 16 μM exprimée en sous-unités) aussi bien pour l'enzyme de type sauvage que pour la totalité des formes tétramériques des différentes enzymes mutées. La détermination de la vitesse de l'étape d'acylation (k_{obs}) pour les GAPDH mutées D186G (k_{cat} = 2 s^{-1}) et (N180G-E276G) (k_{cat} = 186 s^{-1}) a été réalisée en cinétique rapide. Les k_{obs} mesurés sont supérieurs au temps de réponse de l'appareil de cinétique rapide, donc supérieurs à 800 s^{-1}. Ceci suggère fortement que les mutations réalisées n'ont aucun effet sur l'efficacité de l'étape d'acylation. Il serait nécessaire d'entreprendre ces études de cinétique rapide pour les autres GAPDH mutées, en particulier pour celles ayant un k_{cat} de 0,1 s^{-1}, afin de déterminer si elles présentent également une étape d'acylation efficace.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

V) Etude la réactivité de la cystéine essentielle : cas des GAPDH mutées (D186G-E276G) et (N180G-E276G).

L'étude de la réactivité de la cystéine essentielle des GAPDH mutées (D186G-E276G) et (N180G-E276G) a été conduite en utilisant le 2,2' dithiodipyridine (2PDS) comme sonde cinétique. Cette approche a permis de déterminer le pK_{app} de la Cys149 et d'appréhender sa réactivité et donc son caractère nucléophile dans son contexte protéique.

La GAPDH mutée (D186G-E276G) est isolée sous forme strictement dimérique et apoenzyme. Les résultats obtenus montrent qu'une seule entité thiolate est détectée dans la gamme de pH testée 4,5-9,5. Contrairement à l'apoenzyme sauvage dans laquelle la Cys149 présente un pK_{app} de 5,46 et forme une paire d'ions avec le résidu His176, la Cys149 de l'enzyme mutée

présente un pK_{app} de 8,45 et n'est donc pas impliquée dans une paire d'ions $Cys^{-}149$ / $His^{+}176$ (figure 18 page 79a, tableau 6 page 79a). La valeur du pK_{app} de la Cys149 est de 0,48 unité supérieure à celle trouvée dans le mutant H176N (pK_{app} = 7.97 +/- 0.03, Talfournier, 1998) mais de 0.43 unité inférieure à celle d'une cystéine intégrée dans un polypeptide comme le glutathion (pK_{app} = 8,88 +/- 0,02, Marchal et Branlant, 1999). Sa réactivité est 5 fois supérieure à celle du thiolate de l'enzyme de type sauvage suggérant une meilleure accessibilité sans doute due à l'absence de proximité avec le résidu His176.

La GAPDH mutée (N180G-E276G) est produite sous deux formes dimère et tétramère en équilibre, qui sont toutes deux apoenzymes. Les résultats obtenus pour la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) montrent qu'une seule entité thiolate est détectée dans la gamme de pH testée 5-9,5. La valeur du pK_{app} de la Cys 149 (pK_{app} = 8,20) est de 0,25 unité inférieure à celle trouvée dans la GAPDH mutée (D186G-E276G) isolée sous forme strictement dimérique et sa réactivité (k_S^{-} = $22{,}1.10^{+4}$ M^{-1} s^{-1}) est comparable à celle du thiolate de la GAPDH mutée (D186G-E276G) (k_S^{-} = $20{,}5.10^{+4}$ M^{-1} s^{-1}) (figure 19 page 79b, tableau 6 page 79a). La valeur du pK_{app} de la Cys149 est donc de 0,23 unité supérieure à celle trouvée dans le mutant H176N mais de 0,68 unité inférieure à celle d'une cystéine intégrée dans un polypeptide comme le glutathion. Les résultats obtenus pour la forme tétramérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) montrent que la Cys149 est impliquée dans une paire d'ions avec le résidu His176. La valeur du pK_{app} de la Cys149 (pK_{app} = 5,48) est similaire à celle de l'apoenzyme de type sauvage tandis que la valeur de pK_{app} de His176 (pK_{app} = 8,14) est de 0,31 unité inférieure à celle de l'apoenzyme de type sauvage. Les valeurs de réactivité de la cystéine dans la paire d'ions et sous la forme thiolate libre sont similaires à celles de l'apoenzyme de type sauvage. La réactivité de la Cys149 dans la paire d'ions est inférieure d'un facteur 8 à celle de la forme thiolate libre.

VI) Etude de la fixation du cofacteur NAD.

VI.1) Bande d'absorption du complexe enzyme-NAD (bande de Racker).

La bande d'absorption observée lors de la formation du complexe binaire GAPDH-NAD centrée à 360 nm, dite bande de Racker, a été interprétée comme un transfert de charge entre la charge positive du cycle pyridinium du NAD et la charge négative du thiolate de la cystéine essentielle Cys149 (Racker et Krimsky, 1952). Son intensité est indicatrice du bon positionnement (distance et/ou orientation) du cycle pyridinium du NAD par rapport au thiolate de la Cys149.

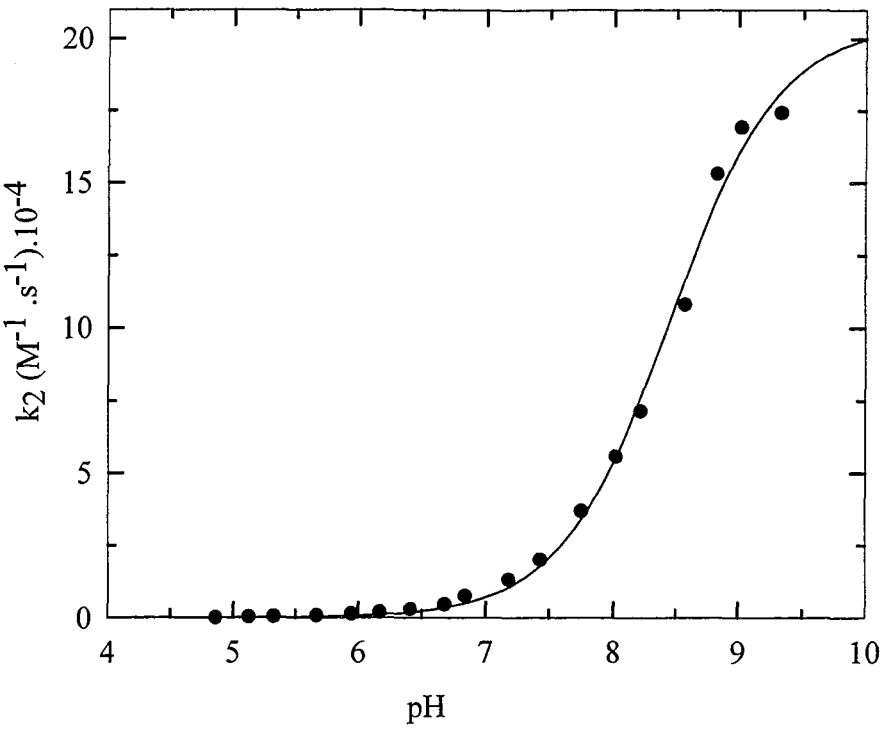


Figure 18 : Variation en fonction du pH de la constante de vitesse de second ordre (k_2) de la réaction de la Cys149 avec le 2,2' dithiodipyridine dans le mutant (D186G-E276G) de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, isolé sous forme strictement dimérique.
Les conditions expérimentales sont celles décrites dans la légende du tableau ci-dessous.

	B. st sauvage [(a)]	(N180G-E276G)		(D186G-E276G)
		Forme tétramérique	Forme dimérique	
k_{IP} (M^{-1} s^{-1})	(5,01 +/- 0,26).10^{+3}	(4,56 +/- 0,08).10^{+3}	/	/
pK_a Cys	5,46 +/- 0,12	5,48 +/- 0,35	8,20 +/- 0,02	8,45 +/- 0,03
k_S^- (M^{-1} s^{-1})	(4,00 +/- 0,14).10^{+4}	(3,89 +/- 0,09).10^{+4}	(22,1 +/- 0,3).10^{+4}	(20,5 +/- 0,5).10^{+4}
pK_a His	8,45 +/- 0,04	8,14 +/- 0,05	/	/

Tableau 6 : Constantes de vitesse de second ordre (k_2) déterminées pour la réaction de la Cys149 avec le 2,2' dithiodipyridine dans le type sauvage, le mutant (D186G-E276G) isolé sous forme strictement dimérique et les formes dimérique et tétramérique du mutant (N180G-E276G), de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.
Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie Matériel et Méthodes page 67. Les données expérimentales ont été ajustées par régression non linéaire avec le logiciel Sigma Plot. ([a]) : tiré de Talfournier, 1998. k_{IP} et k_S^- désignent les constantes de vitesse de second ordre pour le thiolate dans la paire d'ions Cys^-149/His^+176 et pour le thiolate dans la forme $Cys^-149/His176$.

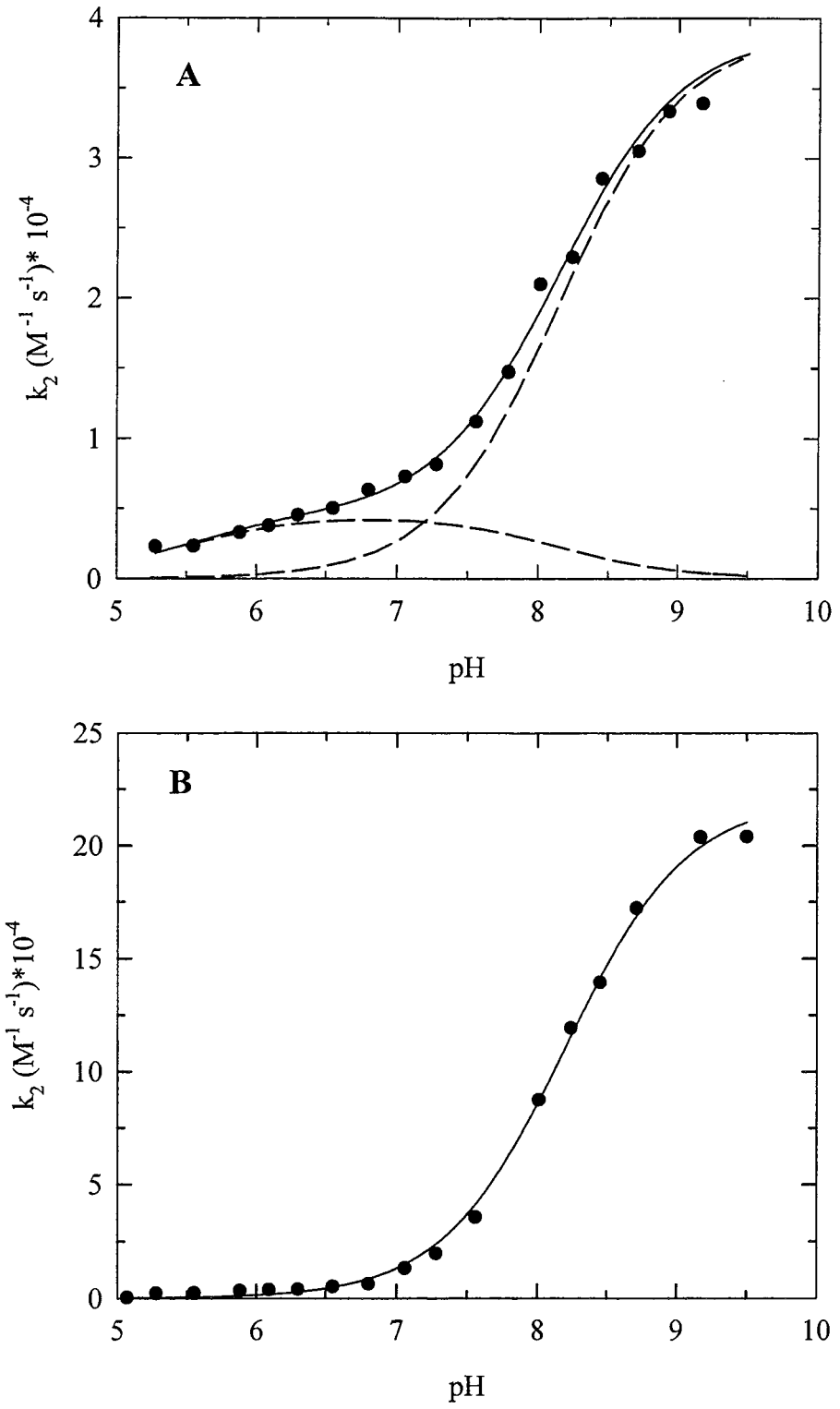


Figure 19 : Variation en fonction du pH de la constante de vitesse de second ordre (k_2) de la réaction de la Cys149 avec le 2,2' dithiodipyridine dans la forme tétramérique (A) et dans la forme dimérique (B) du mutant (N180G-E276G) de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.
Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie Matériel et Méthodes page 67. Les données expérimentales ont été ajustées à l'équation à un ou deux pK_a par régression non linéaire avec le logiciel Sigma Plot. (A) les courbes en pointillés représentent la contribution de chaque pK_a.

Les intensités des bandes d'absorption de l'enzyme de type sauvage et des formes tétramériques des enzymes mutées testées sont peu différentes, environ $\varepsilon_{360nm,\ monomère} = 1000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (tableau 7, page 80a). Par contre, dans le cas des enzymes mutées produites sous forme strictement dimérique et des formes dimériques des enzymes en équilibre dimère-tétramère, l'intensité de la bande d'absorption observée lors de la formation du complexe binaire GAPDH-NAD est de 10 à 12 fois inférieure à celle de l'enzyme de type sauvage (figure 20 page 80b).

L'addition de 1,3dPG à l'enzyme de type sauvage (Harrigan et Trentham, 1973) et aux enzymes mutées, qu'elles soient sous forme tétramérique ou dimérique, préalablement saturées avec le NAD provoque la disparition de la bande d'absorption observée lors de la formation du complexe binaire enzyme-NAD. De la même façon, l'ajout de G3P au complexe binaire formé entre le NAD et les GAPDH testées produites sous forme dimérique, donc inactive, provoque la disparition de la bande d'absorption. En revanche, cette expérience n'est pas réalisable avec des enzymes actives à cause de l'interférence provoquée par l'absorption du NADH formé.

VI.2) Mesure de l'affinité de l'enzyme pour le NAD par inactivation à l'iodoacétamide.

Afin de déterminer si la valeur du K_M du NAD était représentative de l'affinité de l'enzyme pour ce cofacteur, la première approche expérimentale utilisée a consisté à déterminer la constante de dissociation apparente (K_D) du cofacteur en mesurant l'effet protecteur du NAD vis à vis de l'efficacité d'alkylation de la Cys149 par l'iodoacétamide (tableau 8 page 80c).

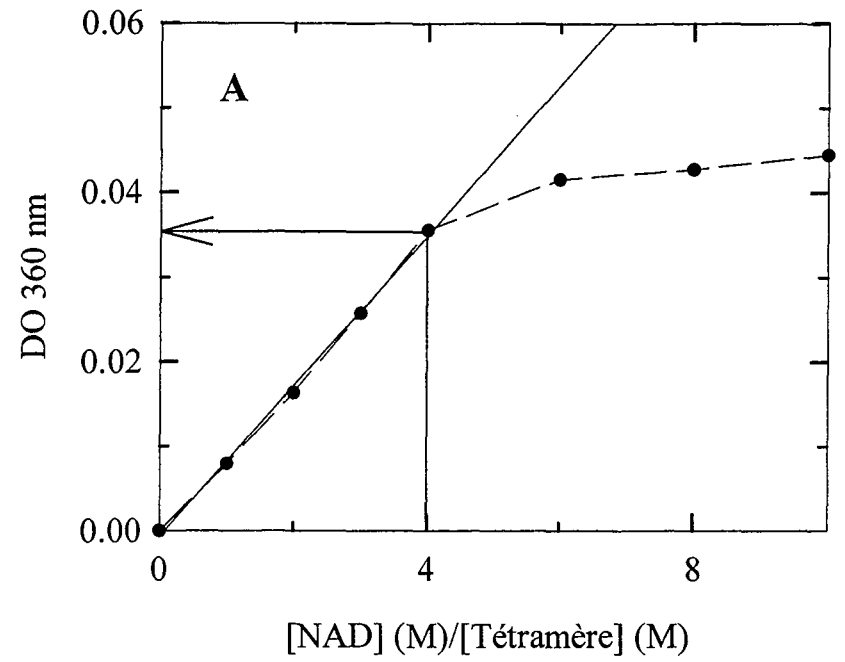
Les résultats obtenus pour les GAPDH mutées S48G, N180G et E276G isolées sous forme strictement tétramérique et pour la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère, montrent qu'il existe une corrélation directe entre la variation du K_M et celle du K_D. Par contre, ce n'est pas le cas du mutant R52G qui présente une constante de dissociation (K_D) plus faible que celle attendue.

VI.3) Mesure de l'affinité du NAD et du NADP par suivi de l'extinction de fluorescence de la protéine.

Cette technique présente l'avantage de pouvoir accéder aux constantes de dissociation microscopiques de chaque site de l'enzyme pour le NAD(P) quelle que soit l'activité de l'enzyme.

	Mutation	$\varepsilon_{360\ nm,\ monomère}$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Tétramère	Sauvage	1000 +/- 75
	Y46G	840 +/- 37
	S48G	870 +/- 32
	R52G	998 +/- 100
	N180G	730 +/- 30
	D186G	892 +/- 52
	E276G	900 +/- 45
	(N180G-D186G)	920 +/- 60
	(N180G-E276G)	960 +/- 100
Dimère	(Y46G-S48G)	90 +/- 11
	(N180G-E276G)	100 +/- 20
	(D186G-E276G)	79 +/- 10

Tableau 7 : Intensité de la bande d'absorption, centrée à 360 nm, observée lors de la formation du complexe binaire GAPDH-NAD.
Les mesures en spectrophotométrie différentielle ont été réalisées à 25°C avec des cuves à double compartiment (voir partie Matériel et Méthodes page 65). Pour toutes les enzymes testées, la concentration en enzyme utilisée est de 80 µM en sous unités, dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, pH 8.



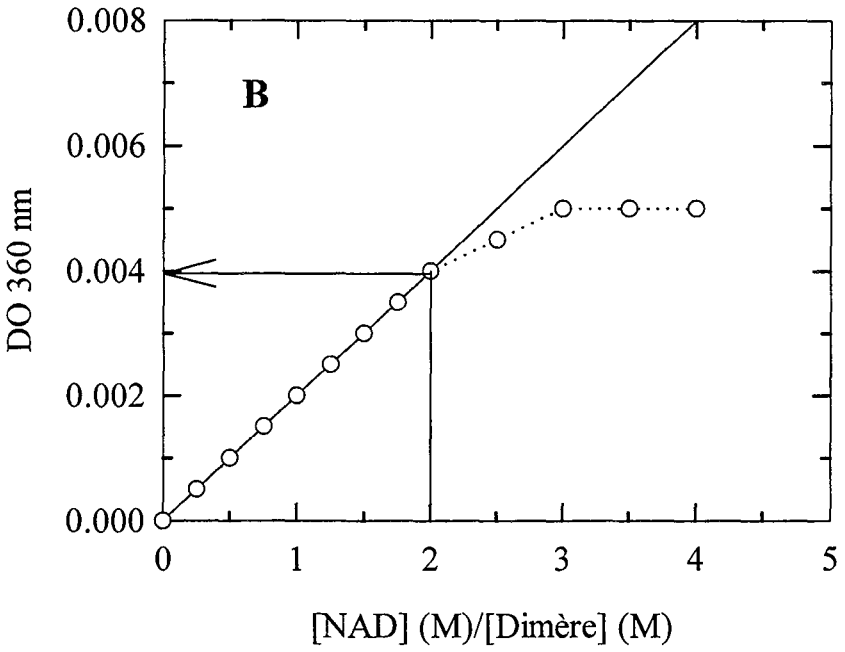


Figure 20 : Intensité de la bande de Racker en fonction du rapport de concentrations [NAD]/[GAPDH].
L'intensité maximale de la bande d'absorption, vers 360nm, est portée en fonction du nombre de moles de NAD par mole de tétramère (ou dimère) de GAPDH. Elle augmente linéairement et présente une rupture de pente pour 1 NAD par site. La valeur du coefficient d'extinction molaire moyen par site est calculée à partir de l'absorption extrapolée à partir de la portion linéaire de la courbe pour 4 (ou 2) NAD par tétramère (ou dimère). Une augmentation de l'intensité maximale de la bande d'absorption est observée au delà de la rupture de pente, probablement en raison d'une fixation aspécifique du NAD. **A** : GAPDH sauvage ; **B** : forme dimérique du mutant (N180G-E276G), en équilibre dimère-tétramère.

	NAD	
Mutation	K_D (µM)	K_M (mM)
Sauvage	1	0,05
S48G	1	0,04
R52G	0.9	0,20
N180G	21	1,74
E276G	0.7	0,07
(N180G-E276G)	9	0,35

Tableau 8 : Détermination de la constante de dissociation apparente (K_D) du NAD en suivant le pouvoir protecteur du NAD vis à vis de l'inactivation par l'iodoacétamide.
La réaction d'inactivation par l'iodoacétamide a été effectuée à 25°C dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5 selon les conditions expérimentales décrites dans la partie Matériel et Méthodes page 61.

Cela permet une comparaison des affinités entre les GAPDH mutées isolées sous forme tétramérique et active et celles isolées sous forme dimérique et inactive.

La fixation du cofacteur a été étudiée par le suivi de l'extinction de fluorescence des résidus tryptophane de la GAPDH de *B. stearothermophilus*. La GAPDH de *B. stearothermophilus* contient 2 résidus tryptophane aux positions 84 et 310. La position du résidu Trp310 à l'intérieur du site actif de l'enzyme, à proximité de la partie nicotinamide du NAD, et des mesures d'extinction de phosphorescence en fonction de la concentration en NAD (Gabellieri *et al*, 1996) suggèrent que le résidu Trp310 contribue majoritairement à l'émission de fluorescence de la GAPDH. Les spectres d'émission de fluorescence des formes apoenzymes des GAPDH de type sauvage et mutées indiquées dans le tableau 9 page 81a, sont similaires avec un maximum situé à 330 nm (courbes non montrées).

Dans le but de comparer l'affinité de chaque GAPDH mutée pour le cofacteur, les valeurs expérimentales obtenues ont été ajustées à la forme logarithmique de l'équation de Hill (voir partie Matériel et Méthodes page 65). Le tracé représente une droite dont la pente donne la valeur du coefficient de Hill (n_H) et l'intersection avec l'axe des abscisses donne la valeur de $\log x_{0,5}$ où $x_{0,5}$ représente la concentration de cofacteur libre (c'est à dire non lié à l'enzyme) nécessaire pour atteindre la demi-saturation (c'est-à-dire respectivement une et deux moles de cofacteur lié par mole d'enzyme dans le cas d'une forme dimérique et d'une forme tétramérique) (figure 21 page 81b). Plus la valeur de $x_{0,5}$ sera faible, meilleure sera l'affinité de l'enzyme pour le cofacteur. La valeur du coefficient de Hill (n_H) nous renseigne sur la coopérativité de l'enzyme : dans notre cas, la valeur de n_H est théoriquement comprise entre 0 et 2, cette dernière valeur représentant le nombre maximal de sites de fixation de l'enzyme pour le cofacteur. Une valeur de n_H respectivement inférieure, égale ou supérieure à 1 est indicatrice d'une coopérativité négative, nulle ou positive pour la fixation du cofacteur. Pour les différentes GAPDH testées, les valeurs des coefficients de Hill (n_H) indiquées dans le tableau 9 page 81a sont en accord avec celles des rapports des constantes de dissociation microscopiques (k_2/k_1) indiquées dans le tableau 10 page 82b. Les valeurs de $x_{0,5}$ du NAD pour les différentes GAPDH mutées, isolées sous forme tétramérique, sont classées par ordre croissant : Y46G ≅ D186G ≅ (N180G-E276G) < S48G ≅ sauvage ≅ N180G ≅ E276G. De même, les valeurs de $x_{0,5}$ du NAD pour les différentes GAPDH mutées, isolées sous forme dimérique, sont classées par ordre croissant : (N180G-E276G) < (Y46G-S48G) = (D186G-E276G). Dans le cas du NADP, la valeur de $x_{0,5}$ du mutant (D186G-E276G), isolé sous forme strictement dimérique, est inférieure à celle de l'enzyme de type sauvage d'un facteur 3.

En se basant sur les valeurs de $x_{0,5}$, il est possible de comparer l'affinité des différentes GAPDH mutées pour le cofacteur. Les mutants (Y46G-S48G) et (D186G-E276G), isolés sous

(A) : NAD

	Mutation	Coefficient de Hill (n_H)	$x_{0,5}$ (µM)
Tétramère	Sauvage	0,66 +/- 0,07	0,12 +/- 0,02
	Y46G	0,53 +/- 0,03	0,04 +/- 0,01
	S48G	0,94 +/- 0,20	0,11 +/- 0,01
	N180G	1,61 +/- 0,20	0,13 +/- 0,02
	D186G	0,82 +/- 0,08	0,06 +/- 0,01
	E276G	0,54 +/- 0,07	0,14 +/- 0,02
	(N180G-E276G)	0,90 +/- 0,07	0,08 +/- 0,01
Dimère	(Y46G-S48G)	1,31 +/- 0,15	2,80 +/- 0,30
	(D186G-E276G)	1,28 +/- 0,13	2,80 +/- 0,30
	(N180G-E276G)	0,81 +/- 0,06	0,04 +/- 0,01

(B) : NADP

Mutation	Coefficient de Hill (n_H)	$x_{0.5}$ (µM)
Sauvage	0,89 +/- 0,09	3,10 +/- 0,30
Dimère (D186G-E276G)	0,65 +/- 0,05	0,80 +/- 0,10

Tableau 9 : Coefficient de Hill (n_H) et concentration de NAD(P) libre à demi-saturation ($x_{0.5}$) pour la GAPDH de type sauvage et les différentes GAPDH mutées, en présence de NAD (A) ou de NADP (B).

Le suivi de l'extinction de fluorescence de la GAPDH de *Bacillus stearothermophilus* par le NAD ou le NADP et le traitement des données ont été réalisés comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes page 63.

A : la concentration en enzyme est de respectivement 2,70 µM, 1,35 µM, 0,4 µM et 0,2 µM (exprimée en sous unités) pour l'enzyme de type sauvage, les formes dimériques, à l'exception de la forme dimérique du mutant (N180G-E276G), les formes tétramériques et la forme dimérique du mutant (N180G-E276G), en équilibre dimère-tétramère.

B : la concentration en enzyme est de 4 µM (exprimée en sous unités) pour l'enzyme de type sauvage et le mutant (D186G-E276G) isolé sous forme strictement dimérique. Le tampon utilisé est Tris/HCl 50 mM pH 8.

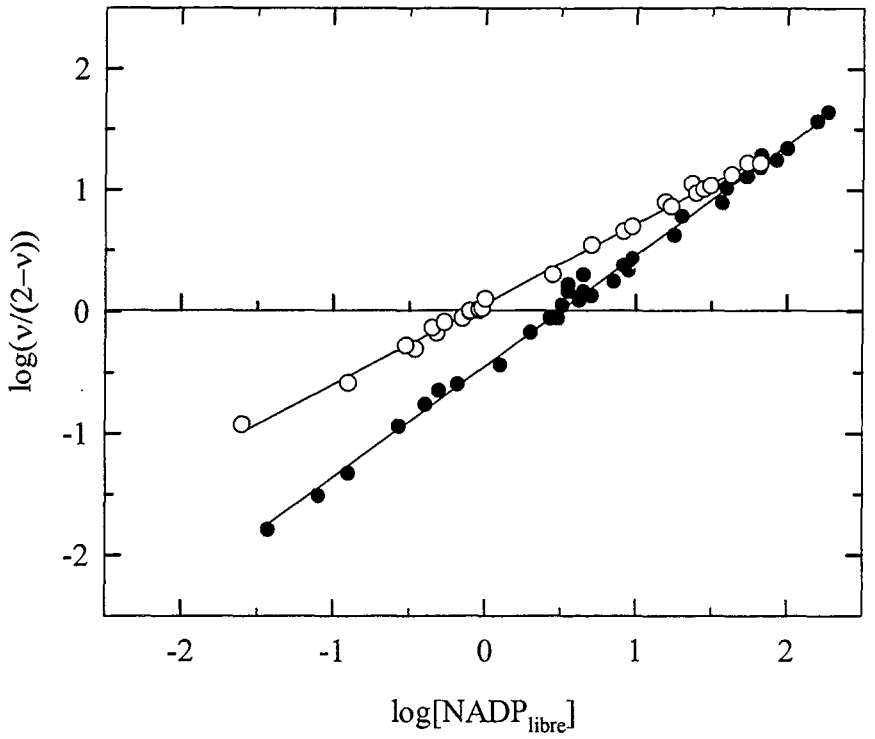


Figure 21 : Représentation de la fixation du NADP par la GAPDH de type sauvage et le mutant (D186G-E276G), suivie par l'extinction de fluorescence, selon la forme logarithmique de l'équation de Hill.

Le logarithme de (ν/(2-ν)) où ν représente le nombre de mole de NADP lié par mole d'enzyme est tracé en fonction du logarithme de la concentration en NADP libre. La pente de la droite donne la valeur du coefficient de Hill (n_H) et l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses donne la valeur de $\log x_{0,5}$ où $x_{0,5}$ représente la concentration de cofacteur libre à demi-saturation. Les valeurs expérimentales sont calculées à partir des valeurs de fluorescence corrigées comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes page 63. Les lignes continues représentent les courbes théoriques tracées à partir des valeurs du coefficient de Hill (n_H) et de $x_{0,5}$ situées dans le tableau 9 page 81a. Les valeurs expérimentales correspondant à l'enzyme de type sauvage (●) et à l'enzyme mutée (D186G-E276G) (O), isolée sous forme strictement dimérique sont également indiquées. La concentration des différentes enzymes est de 4 μM en sous unités dans le tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.

forme strictement dimérique, possèdent une affinité pour le NAD inférieure d'un facteur 23 à celle de l'enzyme de type sauvage à l'inverse de la forme dimérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère, qui possède une affinité pour le NAD 3 fois supérieure à celle de l'enzyme de type sauvage. La forme dimérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère possède une affinité 2 fois supérieure à celle de la forme tétramérique correspondante. Aucune simple mutation indiquée dans le tableau 9 page 81a ne réduit de façon significative l'affinité de l'enzyme pour le NAD. Le mutant (D186G-E276G) isolé sous forme strictement dimérique présente une affinité pour le NADP 3 fois supérieure à celle pour le NAD tandis que l'enzyme de type sauvage présente une affinité pour le NAD 25 fois supérieure à celle pour le NADP.

Pour les différentes GAPDH testées, la comparaison des valeurs des constantes de dissociation (K_D) (tableau 8 page 80c) déterminées en suivant le pouvoir protecteur du NAD vis à vis de l'inactivation par l'iodoacétamide, et des valeurs de $x_{0,5}$ déterminées par suivi de l'extinction de fluorescence, montre que les valeurs de K_D et de $x_{0,5}$ concordent, à l'exception du mutant N180G et de la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère.

Dans un second temps, nous avons étudié la coopérativité de fixation des différents mutants pour le NAD. Comme dans le cas des GAPDH mutées (Y46G-S48G) et (D186G-E276G), isolées sous forme strictement dimérique et décrites dans l'article page 97 (figure 22 page 82a), la fixation du NAD par la forme dimérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère a été décrite avec un minimum de 2 sites de fixation d'affinité différente pour le NAD. Contrairement aux deux GAPDH mutées (Y46G-S48G) et (D186G-E276G) qui fixent le NAD avec une coopérativité positive avec approximativement le même rapport k_2/k_1 d'environ 0,3 et le même coefficient de Hill d'environ 1,3, la forme dimérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère fixe le NAD avec une coopérativité négative marquée avec un rapport $k_2/k_1 = 2,6$ et un coefficient de Hill $n_H = 0,8$ (tableaux 9 et 10 pages 81a et 82b, figure 23 page 82c). Comme dans le cas de la GAPDH de type sauvage et des GAPDH mutées Y46G, S48G, D186G et E276G isolées sous forme strictement tétramérique et décrites dans l'article page 97, la fixation du NAD par la GAPDH mutée N180G isolée sous forme strictement tétramérique et la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère a été décrite avec un minimum de 2 constantes de dissociation qui correspondent aux deux sites de fixation de chacun des deux dimères indépendants constituant le tétramère. Les GAPDH mutées Y46G, D186G et E276G isolées sous forme strictement tétramérique fixent le NAD avec une coopérativité négative, tandis que la GAPDH mutée S48G et la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère fixent le NAD avec une absence de coopérativité significative. La GAPDH mutée N180G

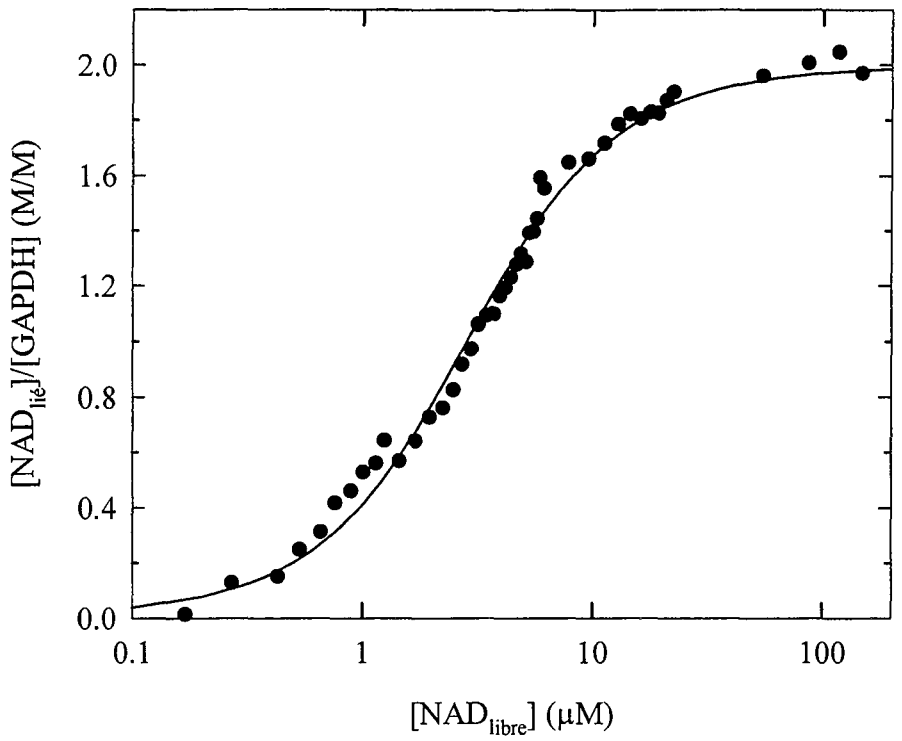


Figure 22 : Etude de la fixation du NAD par le mutant (Y46G-S48G), isolé sous forme strictement dimérique, de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, par le suivi de l'extinction de fluorescence.

Le nombre de moles de NAD lié par mole d'enzyme (isolée sous forme strictement dimérique) est tracé en fonction de la concentration en NAD libre. Les valeurs expérimentales sont calculées à partir des valeurs de fluorescence corrigées comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes page 63. La ligne continue représente la courbe théorique tracée à partir des constantes de dissociation microscopiques situées dans le tableau 10 page 82b.

Les valeurs expérimentales correspondant à l'enzyme mutée (Y46G-S48G) isolée sous forme strictement dimérique (●) sont également représentées. La concentration en enzyme (exprimée en sous unité) est de 1,35 µM dans le tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.

(A) : NAD

	Mutation	k_1 (µM)	k_2 (µM)	k_2/k_1
Tétramère	Sauvage	0,060 +/- 0,014	0,25 +/- 0,02	4
	Y46G	0,015 +/- 0,002	0,12 +/- 0,01	8
	S48G	0,10 +/- 0,01	0,13 +/- 0,01	1,3
	N180G	0,59 +/- 0,12	0,029 +/- 0,005	0,05
	D186G	0,040 +/- 0,008	0,090 +/- 0,001	2,25
	E276G	0,052 +/- 0,010	0,40 +/- 0,08	8
	(N180G-E276G)	0,062 +/- 0,006	0,100 +/- 0,009	1,7
Dimère	(Y46G-S48G)	5,54 +/- 0,60	1,43 +/- 0,14	0,26
	(D186G-E276G)	5,20 +/- 0,43	1,51 +/- 0,16	0,29
	(N180G-E276G)	0,025 +/- 0,004	0,064 +/- 0,007	2,6

(B) : NADP

Mutation	k_1 (µM)	k_2 (µM)	k_2/k_1
Sauvage	2,48 +/- 0,32	4,0 +/- 0,6	1,6
Dimère (D186G-E276G)	0,37 +/- 0,07	1,68 +/- 0,35	4,5

Tableau 10 : Constantes de dissociation microscopiques du type sauvage et des mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* pour le NAD (A) et le NADP (B).
Le suivi de l'extinction de fluorescence de la GAPDH de *Bacillus stearothermophilus* par le NAD ou le NADP et le traitement des données ont été réalisés comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes page 63.
A : la concentration en enzyme est de respectivement 2,70 µM, 1,35 µM, 0,4 µM et 0,2 µM (exprimée en sous unités) pour l'enzyme de type sauvage, les formes dimériques, à l'exception de la forme dimérique du mutant (N180G-E276G), les formes tétramériques et la forme dimérique du mutant (N180G-E276G), en équilibre dimère-tétramère.
B : la concentration en enzyme est de 4 µM (exprimée en sous unités) pour l'enzyme de type sauvage et le mutant (D186G-E276G) isolé sous forme strictement dimérique. Le tampon utilisé est Tris/HCl 50 mM pH 8.

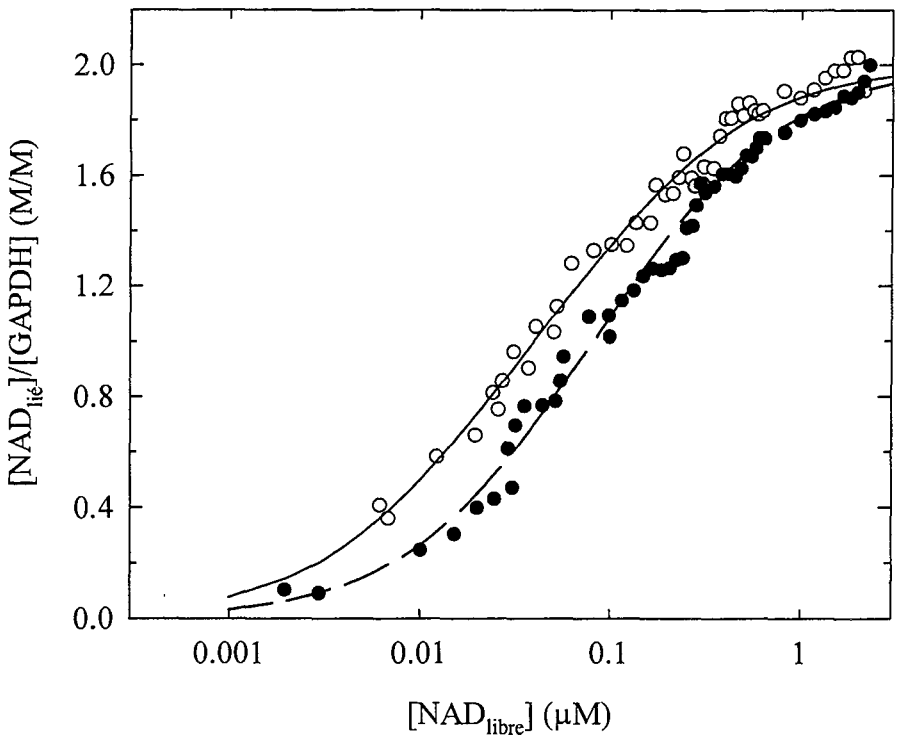


Figure 23 : Etude de la fixation du NAD par les formes tétramérique et dimérique de l'enzyme mutée (N180G-E276G), par le suivi de l'extinction de fluorescence.
Le nombre de moles de NAD lié par mole d'enzyme (isolée sous forme tétramérique ou sous forme dimérique) est tracé en fonction de la concentration en NAD libre. Les valeurs expérimentales sont calculées à partir des valeurs de fluorescence corrigées comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes page 63. Les lignes continues et en pointillés représentent les courbes théoriques tracées à partir des constantes de dissociation microscopiques situées dans le tableau 10 page 82b.
Les valeurs expérimentales correspondant à la forme tétramérique (●) et à la forme dimérique (O) de l'enzyme mutée (N180G-E276G) sont également représentées. La concentration des formes tétramérique et dimérique de l'enzyme mutée (N180G-E276G) (exprimée en sous unité) est de respectivement 0,4 µM et 0,2 µM dans le tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.

isolée sous forme strictement tétramérique, quant à elle, fixe le NAD avec une coopérativité positive marquée avec un rapport k_2/k_1 = 0,05 et un coefficient de Hill n_H = 1,6 (figure 24 page 83a). En se basant sur la comparaison des rapports k_2/k_1 ou des coefficients de Hill, les GAPDH mutées Y46G et E276G présentent une coopérativité négative plus prononcée que celle de l'enzyme de type sauvage à l'inverse de la GAPDH mutée D186G qui présente une coopérativité négative moins prononcée que celle de l'enzyme de type sauvage.

En utilisant le NADP comme cofacteur, la GAPDH de type sauvage et la GAPDH mutée (D186G-E276G) isolée sous forme strictement dimérique présentent respectivement une absence de coopérativité significative et une coopérativité négative pour la fixation du NADP (tableaux 9 et 10 pages 81a et 82b, figure 25 page 83b).

VII) Stabilité des mutants vis-à-vis de la dénaturation thermique, suivie par calorimétrie différentielle.

Les expériences de calorimétrie différentielle ont été réalisées par le Pr. Muronetz et ses collaborateurs de l'Institut A.N. Belosersky de Biologie Physico-Chimique de l'Université d'Etat de Moscou, comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes page 68.

Dans un premier temps, les résultats obtenus pour les formes apoenzymes des différentes GAPDH mutées sont comparés avec ceux obtenus pour l'apoenzyme de type sauvage. La GAPDH mutée (Y46G-R52G) isolée sous forme strictement dimérique, la forme dimérique du mutant D282G en équilibre dimère-tétramère et les formes dimériques et tétramériques des différents mutants en équilibre dimère-tétramère, à savoir (N180G-E276G) et (W84F-Y283V), ont toutes un t_{max} inférieur à celui de l'apoenzyme de type sauvage (tableau 11 page 83c). En absence de NAD, le t_{max} des formes tétramériques des mutants (N180G-E276G) et (W84F-Y283V) en équilibre dimère-tétramère est plus faible que celui de l'apoenzyme de type sauvage de respectivement 4,9 et 9,5°C alors que le t_{max} des différentes formes dimériques testées est d'au minimum 12 °C inférieur à celui de l'apoenzyme de type sauvage. Le t_{max} des formes dimériques des mutants (Y46G-R52G), D282G, (W84F-Y283V) et (N180G-E276G) est plus faible que celui de l'apoenzyme de type sauvage de respectivement 17,7 (12,8), 12, 18,9, et 12,1°C. Dans le cas de la GAPDH mutée (Y46G-R52G) isolée sous forme strictement dimérique, deux pics sont présents sur le thermogramme et leur t_{max} diffère d'environ 5°C (figure 26 page 83d). Ces deux pics correspondraient au domaine de fixation du cofacteur et au domaine catalytique cependant il n'est

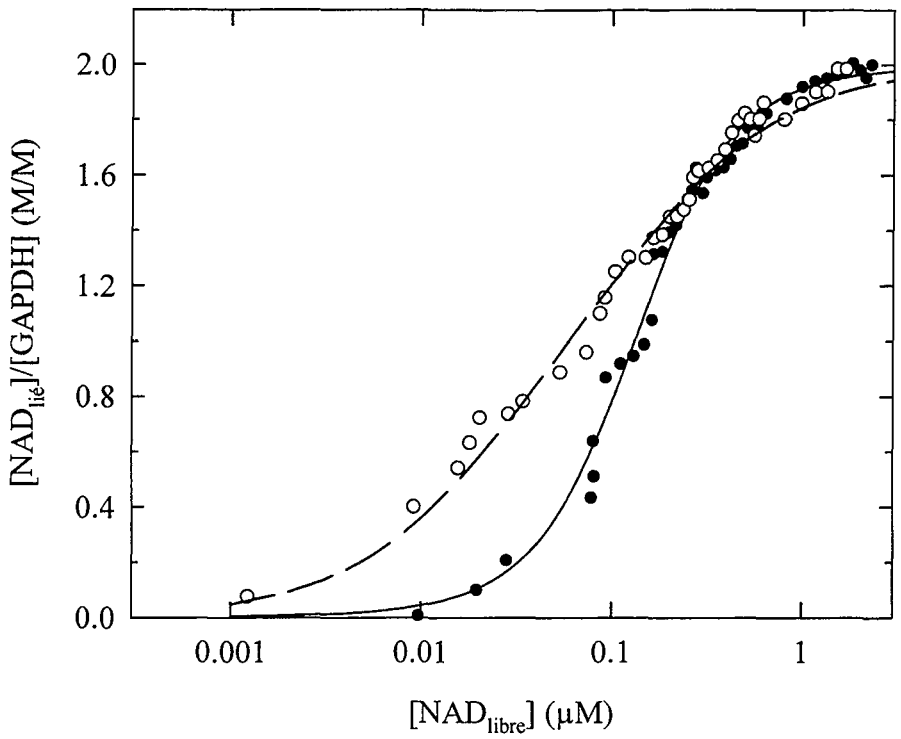


Figure 24 : Etude de la fixation du NAD par les mutants N180G et D186G de la GAPDH de *B. stearothermophilus* par le suivi de l'extinction de fluorescence.
Le nombre de moles de NAD lié par mole d'enzyme est tracé en fonction de la concentration en NAD libre. Les valeurs expérimentales sont calculées à partir des valeurs de fluorescence corrigées comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes page 63. Les lignes continues et en pointillés représentent les courbes théoriques tracées à partir des constantes de dissociation microscopiques situées dans le tableau 10 page 82b.
Les valeurs expérimentales correspondant aux enzymes mutées isolées sous forme strictement tétramérique N180G (●) et D186G (O) sont également représentées. La concentration des enzymes mutées N180G et D186G (exprimée en sous unité) est de 0,4 µM dans le tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.

NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

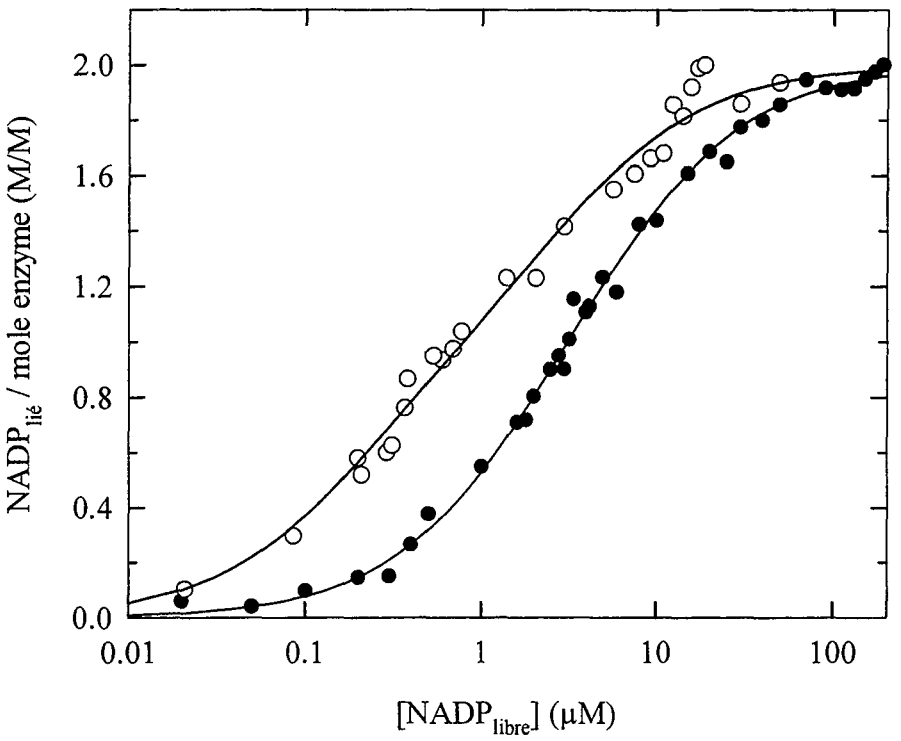


Figure 25 : Etude de la fixation du NADP par le type sauvage et le mutant (D186G-E276G), isolé sous forme strictement dimérique, de la GAPDH de *B. stearothermophilus*, par le suivi de l'extinction de fluorescence.

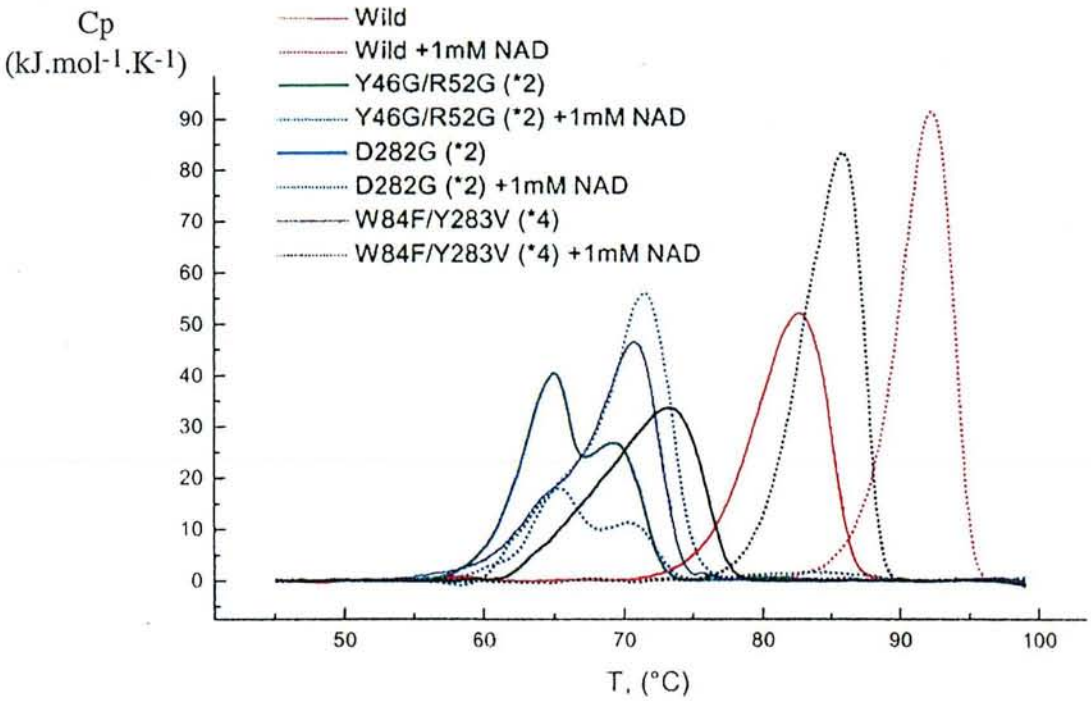
Le nombre de moles de NADP lié par mole d'enzyme est tracé en fonction de la concentration en NADP libre. Les valeurs expérimentales sont calculées à partir des valeurs de fluorescence corrigées comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes page 63. Les lignes continues représentent les courbes théoriques tracées à partir des constantes de dissociation microscopiques situées dans le tableau 10 page 82b. L'enzyme de type sauvage (●) et l'enzyme mutée (D186G-E276G) isolée sous forme strictement dimérique (O) sont représentées. La concentration de l'enzyme de type sauvage et de l'enzyme mutée (D186G-E276G) isolée sous forme strictement dimérique, exprimée en sous unité, est de 4 µM dans le tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

Mutation		t_{max} (°C)	Cp_{max} ($kJ.mol^{-1}.K^{-1}$)	ΔH^{cal} ($kJ.mol^{-1}$)	Largeur à mi-hauteur des pics (°C)
Sauvage	T, apo	82,7	51,9	346	6,3
	T, + NAD	92,3	91,3	447	4,4
(Y46G-R52G)	D, apo	64,9 / 69,9	40,1 / 26	308	8,5
	D, + NAD	65,3 / 70,5	17,8 /12,5	152	9,3
D282G	D, apo	70,7	46,3	340	6,5
	D, + NAD	71,5	55,7	391	5,8
(W84F-Y283V)	T, apo	73,2	33,4	291	8,5
	T, + NAD	85,9	83,1	440	5
	D, apo	63,8	27,1	190	7
	D, + NAD	65	26,8	181	6,1
(N180G-E276G)	T, apo	77,8	40,1	256	5,7
	T, + NAD	84,6	58,2	330	5,2
	D, apo	70,6	22,1	173	6,9
	D, + NAD	71,3	27	215	5,8

Tableau 11 : Calorimétrie différentielle du type sauvage et des mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

Les mesures ont été réalisées comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes page 68. Les concentrations des échantillons sont de 1 mg/ml (soit environ 28 µM de sous unités) dans le tampon KH_2PO_4 – KOH 100 mM, pH 8. Les lettres D et T désignent respectivement la forme dimérique et la forme tétramérique. Apo et + NAD désignent respectivement la forme apoenzyme seule et la forme apoenzyme en présence de NAD 1 mM final. Cp_{max} et ΔH^{cal} représentent respectivement le maximum de la capacité calorifique partielle et l'enthalpie calorimétrique.



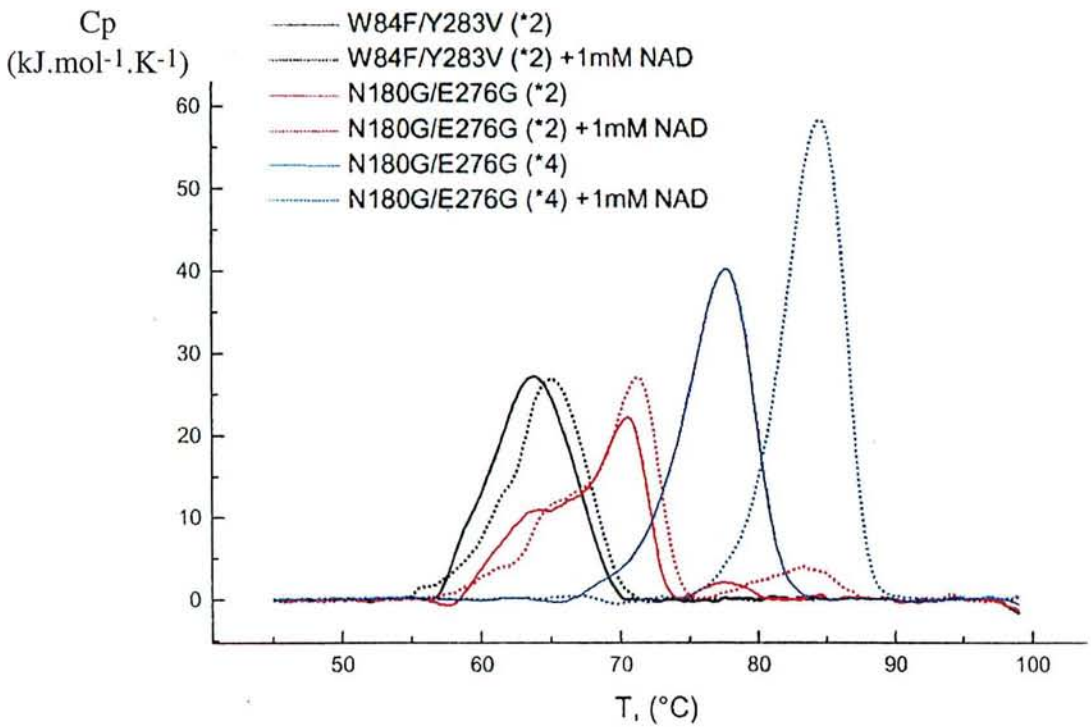


Figure 26 : Variation, en fonction de la température, de la capacité calorifique partielle du type sauvage et des mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

Une couleur différente est attribuée à chaque mutant. Les lignes continues représentent les enzymes sous forme apo et les lignes pointillées les enzymes apo en présence de 1 mM final de NAD tamponné. La ligne de base du tampon a été soustraite des valeurs expérimentales. Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le tableau 11 page 83 c. Les chiffres entre parenthèses désignent le nombre de sous-unités (2) dimère, (4) tétramère.

pas possible de les assigner (Levashov *et al*, 1999). Dans le cas des GAPDH mutées (N180G-E276G) et (W84F-Y283V) isolées sous deux formes, dimère et tétramère en équilibre, le t_{max} de la forme tétramérique apoenzyme est plus élevé que celui de la forme dimérique apoenzyme de respectivement 7,2 et 9,4°C.

Un effet protecteur du cofacteur vis à vis de la dénaturation thermique a été mis en évidence pour les différentes formes tétramériques testées, en présence de concentrations saturantes de NAD. Cet effet protecteur est plus marqué pour l'enzyme de type sauvage et la forme tétramérique du mutant (W84F-Y283V) en équilibre dimère-tétramère, avec une augmentation du t_{max} de respectivement 9,6 et 12,7 °C par rapport à la forme apoenzyme correspondante, que pour la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère, avec une augmentation du t_{max} de 6,8°C par rapport à la forme apoenzyme correspondante. Par contre, pour toutes les formes dimériques testées, l'effet protecteur du NAD est peu marqué avec une augmentation du t_{max} inférieure à 1°C par rapport à la forme apoenzyme correspondante.

L'ajout de NAD diminue de façon significative la largeur à mi-hauteur des pics du thermogramme correspondant aux espèces tétramériques suggérant que la dénaturation du domaine de fixation du cofacteur et la dénaturation du domaine catalytique deviennent plus coopératives (tableau 11 page 83c). En effet, dans le cas de l'enzyme de type sauvage et des formes tétramériques mutées (W84F-Y283V) et (N180G-E276G), la largeur à mi-hauteur des pics du thermogramme est réduite de respectivement 1,9, 3,5, et 0,5°C. Dans le cas des formes dimériques testées, à l'exception de la GAPDH mutée (Y46G-R52G) isolée sous forme strictement dimérique, l'ajout de NAD s'accompagne d'une légère diminution de la largeur à mi-hauteur des pics du thermogramme d'environ 1°C, suggérant aussi que la dénaturation des domaines de fixation du cofacteur et catalytique devient plus coopérative.

Les pics du thermogramme correspondant aux différentes formes tétramériques testées (en absence et en présence de NAD) ne présentent pas d'épaulement à l'inverse de ceux qui correspondent aux différentes formes dimériques testées. Les épaulements présents (en absence et en présence de NAD) pour les formes dimériques testées sont plus ou moins marqués : ils sont respectivement très peu marqués, peu marqués, fortement marqués et très fortement marqués dans le cas des mutants (W84F-Y283V), D282G, (N180G-E276G) et (Y46G-R52G). Ces épaulements correspondraient soit au domaine catalytique, soit au domaine de fixation du cofacteur. Pour la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G), un pic supplémentaire de faible amplitude, correspondant à la présence d'une contamination par la forme tétramérique, est détecté aussi bien en absence qu'en présence de NAD.

VIII) Article.

Biochemistry **1999**, *38*, 16084–16091

Dimers Generated from Tetrameric Phosphorylating Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* Are Inactive but Exhibit Cooperativity in NAD Binding†

Olivier Roitel, Eduard Sergienko,‡ and Guy Branlant*

Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Faculté des Sciences, UMR 7567 CNRS-UHP, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cédex, France

Received June 4, 1999; Revised Manuscript Received September 28, 1999

ABSTRACT: Tetrameric phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Bacillus stearothermophilus* has been described as a "dimer of dimers" with three nonequivalent interfaces, *P*-axis (between subunits O and P and between subunits Q and R), *Q*-axis (between subunits O and Q and between subunits P and R), and *R*-axis interface (between subunits O and R and between subunits P and Q). *O*–*P* dimers, the most stable and the easiest to generate, have been created by selective disruption of hydrogen bonds across the *R*- and *Q*-axis interfaces by site-directed mutagenesis. Asp-186 and Ser-48, and Glu-276 and Tyr-46, which are hydrogen bond partners across the *R*- and *Q*-axis interfaces, respectively, have been replaced with glycine residues. All mutated residues are highly conserved among GAPDHs from different species and are located in loops. Both double mutants D186G/E276G and Y46G/S48G were dimeric, while all single mutants remained tetrameric. As previously described [Clermont, S., Corbier, C., Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A., and Branlant, G. (1993) *Biochemistry 32*, 10178–10184], NAD binding to wild type GAPDH (wtGAPDH) was interpreted according to the induced-fit model and exhibited negative cooperativity. However, NAD binding to wtGAPDH can be adequately described in terms of two independent dimers with two interacting binding sites in each dimer. Single mutants D186G, E276G, and Y46G exhibited behavior in NAD binding similar to that of the wild type, while both dimeric mutants D186G/E276G and Y46G/S48G exhibited positive cooperativity in binding the coenzyme NAD. The fact that *O*–*P* dimer mutants retained cooperative behavior shows that (1) the *P*-axis interface is important in transmitting the information induced upon NAD binding inside the *O*–*P* dimer from one subunit to the other and (2) the S-loop of the *R*-axis-related subunit is not directly involved in cooperative binding of NAD in the *O*–*P* dimer. In both *O*–*P* dimer mutants, the absorption band of the binary enzyme–NAD complex had a highly decreased intensity compared to that of the wild type and, in addition, totally disappeared in the presence of G3P or 1,3-dPG. However, no enzymatic activity was detected, indicating that the formed ternary enzyme–NAD–G3P or –1,3-dPG complex was not catalytically efficient. In the *O*–*P* dimers, the interaction with the S-loop of the *R*-axis-related subunit is disrupted, and therefore, the S-loop should be less structured. This resulted in increased accessibility of the active site to the solvent, particularly for the adenosine-binding site of NAD. Thus, together, this is likely to explain both the lowered affinity of the dimeric enzyme for NAD and the absence of activity.

Many enzymes exist as oligomers of identical subunits. Among these oligomeric enzymes, dimers and tetramers are the most common species (*1*). While each subunit has only a single recognition site for a like subunit within a dimer, the existence of a second set of bonding sites leads to the formation of a tetramer. The main advantages of the oligomeric state have usually been described as improved stability of the enzyme and regulation of the enzymatic activity through interaction between subunits (*2*, *3*). To determine the role of the quaternary structure, properties of dissociated oligomeric enzymes have been studied. Two different approaches are utilized to dissociate oligomeric enzymes. The first approach consists of varying different physicochemical parameters such as pressure, temperature, pH, ionic strength, or concentration of effectors. The second approach, which was utilized in this study, is based on the known three-dimensional structure and molecular modeling for identifying and site-directed mutagenesis for characterizing the residues implied in intersubunit stabilizing interactions.

Only a minority of the oligomeric enzymes composed of identical subunits exhibit cooperative behavior (*1*). Many of the concepts of cooperative interactions come from studies on tetrameric phosphorylating GAPDHs.[1] Coenzyme binding to GAPDH was shown to exhibit either positive or negative cooperativity, depending on the source of the enzyme. Yeast

† This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the University Henri Poincaré Nancy I.

* To whom all correspondence should be addressed. Phone: 33 3 83 91 20 97. Fax: 33 3 83 91 20 93. E-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

‡ Present address: Department of Chemistry, Rutgers, the State University of New Jersey, Newark, NJ 07102.

10.1021/bi9912802 CCC: $18.00 © 1999 American Chemical Society
Published on Web 11/11/1999

GAPDH binds NAD with positive cooperativity at 40 °C and pH 8.5 (*4*), while GAPDHs isolated from rabbit (*5*, *6*), sturgeon (*7*, *8*), and lobster (*9*) muscles, *Escherichia coli* (*10*), and *Bacillus stearothermophilus* (*11*, *12*) exhibited negative cooperativity in binding the coenzyme NAD. Several models have been proposed to explain cooperative ligand binding to an oligomeric protein. The concerted model of Monod, Wyman, and Changeux (*13*) is only consistent with positive cooperativity. Two other models have been proposed to describe both negative and positive cooperativity. In the preexisting asymmetry model (*14*, *15*), symmetric and asymmetric quaternary conformations of the protein are in equilibrium. The character of cooperativity is explained as a result of the relative presence and affinities of the states. Alternatively, in the induced-fit model (*16*), enzymes both unligated and fully ligated with NAD are symmetric. NAD binding to the first subunit induces conformational changes that extend to subunit interfaces and affect the affinity of the neighboring subunit for NAD. Several studies on sturgeon GAPDH in solution (*7*, *8*) have been satisfactorily interpreted according to the preexisting asymmetry model asssumptions, whereas those on GAPDH from *B. stearothermophilus* (*11*, *17*) supported the induced-fit model.

B. stearothermophilus GAPDH reversibly catalyzes the oxidative phosphorylation of D-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) to 1,3-diphosphoglycerate (1,3-dPG) in the presence of NAD and inorganic phosphate (P_i) (*18*). As all other GAPDHs with known crystallographic structures, *B. stearothermophilus* GAPDH is a homotetramer with 222 symmetry. In other words, the tetramer could be described as a dimer of dimers (Figure 1) with three nonequivalent interfaces (*19*, *20*). The *P*-axis interface (between subunits O and P and between subunits Q and R) is the most extended interface (2400 Å^2) (*20*). The *R*-axis interface (between subunits O and R and between subunits P and Q) is smaller (1700 Å^2) (*20*). Finally, the *Q*-axis interface (between subunits O and Q and between subunits P and R) extends only through 600 Å^2 (*20*). The most extensive intersubunit interactions are formed by the *P*-axis-related monomers, with 48 residues per subunit containing atoms less than 4 Å from an atom in the adjoining subunit (*19*). There are 26 such residues per subunit in the *R*-axis-related subunits and only nine in the *Q*-axis interface. Molecular modeling of the three possible dimers showed that a total number of 222, 245, 286, and 300 hydrophobic residues (*21*) are exposed to the solvent in the wild type tetramer, *O*−*P* dimer, *O*−*R* dimer, and *O*−*Q* dimer, respectively. Therefore, because of the strength of the *P*-axis interface and of the lowest number of hydrophobic residues in contact with the solvent, the *O*−*P* dimer should be the most stable and the easiest to generate by protein engineering.

In the work presented here, several mutants across the *R*- and *Q*-axis interfaces of the GAPDH from *B. stearothermophilus* were generated, and their biochemical properties

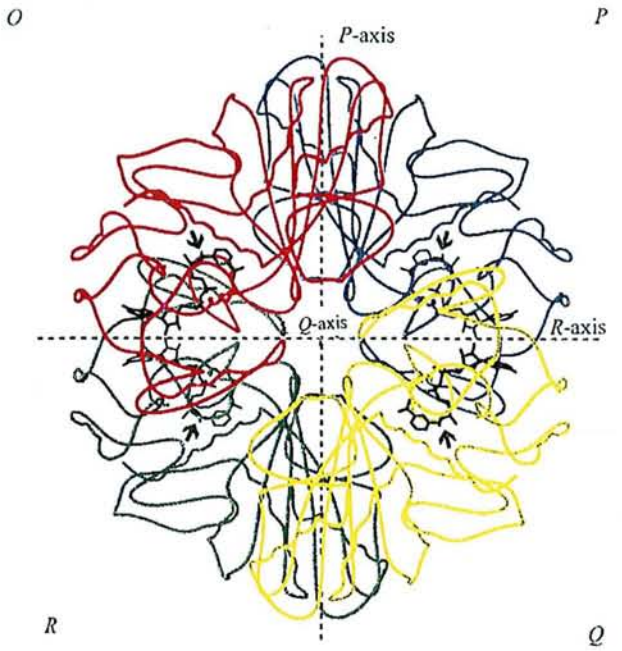


FIGURE 1: Spatial organization of the four subunits of the holo form of the GAPDH from *B. stearothermophilus* (*19*). Subunits *O*, *P*, *Q*, and *R* are represented by letters and colors red, blue, yellow, and green, respectively. Each colored line represents the main chain backbone of the subunit. Dashed lines represent the symmetry axes. The *Q*-axis is perpendicular to the plane of the paper. NAD is drawn in black lines. The arrow designates the S-loop.

were investigated. Two different double mutations led to *O*−*P* dimers. Both dimeric GAPDHs were enzymatically inactive yet able to bind NAD and G3P or 1,3-dPG. In addition, both dimeric GAPDH mutants exhibited cooperativity in binding the coenzyme NAD. All these results are discussed in relation with the high-resolution three-dimensional structure of GAPDH from *B. stearothermophilus*.

MATERIALS AND METHODS

Molecular Modeling. Molecular modeling was carried out on an INDIGO^2 Extreme Silicon Graphics workstation with the Brugel molecular modeling package version 10.1 (*22*). The crystallographic structure of the holo form of *B. stearothermophilus* GAPDH was taken from the Brookhaven Protein Data Bank (*23*), access code 1gd1.

Site-Directed Mutagenesis. Site-directed mutagenesis was performed using the method of Kunkel (*24*) on a pBluescript II SK containing the *gap* gene of *B. stearothermophilus* under the control of the *lac* promoter. The mutated genes were then sequenced to verify that no other mutation had arisen.

Production and Purification of the Mutant GAPDHs of B. stearothermophilus. Expression of GAPDH from *B. stearothermophilus* was carried out in *E. coli* strain HB101 as previously described (*25*). After sonication of the cell pellet, GAPDH was purified by ammonium sulfate fractionation (66−92%) and size-exclusion chromatography on ACA 34 resin equilibrated in 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) containing 2 mM EDTA (buffer A). The resulting mixture of endogenous GADPH from *E. coli* and expressed GAPDH of *B. stearothermophilus* was separated on a Q-Sepharose FPLC column (Pharmacia), using a linear gradient from 0 to 200 mM KCl in buffer A.

B. stearothermophilus GAPDH was further purified on Phenyl-Sepharose (Pharmacia) equilibrated with buffer A,

[1] Abbreviations: GAPDH, phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; wtGAPDH, wild type glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; D-G3P, D-glyceraldehyde 3-phosphate; 1,3-dPG, 1,3-diphosphoglycerate; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form); NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form); P_i, inorganic phosphate; SDS−PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate; Tris, *N*-tris(hydroxymethyl)aminomethane.

containing 1.7 M $(NH_4)_2SO_4$. GAPDH was eluted with a linear gradient from 1.7 to 0 M $(NH_4)_2SO_4$ in buffer A, resulting in the homogeneous enzyme as verified by 10% SDS–PAGE (*26*). The molecular masses of all proteins were confirmed by mass spectrometry. The enzyme concentration was determined spectrophotometrically using absorption coefficients at 280 nm of 1.17×10^5 and 1.31×10^5 M^{-1} cm^{-1} for tetrameric apo and holo enzymes, respectively, to give the molar concentration of the oligomer (*10*, *27*). In the case of the dimeric apoenzyme, the value of 5.85×10^4 M^{-1} cm^{-1} was used.

Enzyme Assays and Kinetics. Initial rate measurements were carried out at 25 °C on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer by following the absorbance of NADH at 340 nm, as previously described (*25*). Data were fitted to the Michaelis–Menten equation using least-squares regression analysis to determine k_{cat} and K_M. The turnover number (k_{cat}) was expressed per active site (N). All K_M values were determined at saturating concentrations of all other substrates.

Native Molecular Mass Determination. Native molecular mass determination for mutant proteins was performed by gel filtration using a Superose 12 FPLC column (Pharmacia) equilibrated with buffer A containing 150 mM KCl, at a flow rate of 0.2 mL/min. For calibration, the following molecular mass standards (Bio-Rad) were used: (1) vitamin B_{12} (1.35 kDa), (2) myoglobin (horse, 17.5 kDa), (3) ovalbumin (chicken, 44 kDa), (4) γ-globulin (beef, 158 kDa), and (5) tyroglobulin (670 kDa). The void and total volumes of the column, 6.9 and 18.2 mL, respectively, were determined with potassium bichromate and blue dextran dyes to enable calculation of the distribution coefficient K_{av}.

Sucrose Density Gradient Centrifugation. Gradients of 5 to 20% sucrose in buffer A with final volumes of 12 mL were set up in polyallomer tubes. Protein samples in buffer A were gently layered on top of the gradient. Centrifugation was performed with a Beckman L8-70M ultracentrifuge using a Beckman SW41 swing-bucket rotor (39 000 rpm for 24 h at 20 °C). Following centrifugation, 500 μL aliquots were withdrawn and the protein concentration was determined according to the Bradford procedure (*28*). Svedberg coefficients were calculated as previously described (*29*).

Absorption Band of the Binary Enzyme–NAD Complex (Racker Band). Measurements of the intensity of the absorption band, centered at 360 nm (*30*), were carried out as previously described (*31*). The temperature of the samples was maintained at 25 °C. The apoenzyme form of the wild type and Y46G, S48G, and E276G mutants was prepared by passage through an Affi-blue gel column (Bio-Rad) (*32*). Absorbance ratios (OD_{280}/OD_{260}) equal to 2 were obtained for wild type and mutant apoenzymes. The extinction of the absorption band by G3P (1 mM final concentration) or 1,3-dPG (0.5 mM final concentration) has been monitored as previously described (*33*).

Spectrofluorometric Measurements. Determination of NAD binding affinities at 25 °C was performed as previously described for the *E. coli* (*10*) and *B. stearothermophilus* (*11*) enzymes. In short, quenching of tryptophan fluorescence by NAD was used to monitor the binding of NAD to both wild type and mutant enzymes. Fluorescence measurements were performed with a SAFAS flx spectrofluorometer equipped with a mixing propeller. Excitation and emission wavelengths were set at 297 and 330 nm, respectively. Fluorescence intensities were corrected for the screening effect due to the absorption of NAD, for Raman emission by subtracting the buffer emission spectrum, and for additionnal quenching of fluorescence due to nonspecific binding of NAD to the enzyme at high concentrations of NAD. Assuming that changes in fluorescence follow closely the fraction of monomers saturated with NAD, we recalculated the data to give fractional saturation and free ligand concentration with the following equations:

$$\bar{Y} = \frac{F_0 - F_i}{F_0 - F_f}$$

and

$$N_f = N_t(1 - \bar{Y})$$

where $\bar{Y}$ is fractional saturation, F_0, F_i, and F_f are the initial, current, and corrected (for the screening effect, Raman emission, and nonspecific binding of NAD) values of fluorescence, respectively, and N_t and N_f are the total and free concentration of NAD, respectively. The fractional saturation was directly fitted to the following equation to obtain values of microscopic dissociation constants for dimeric enzymes (*34*):

$$\bar{Y} \equiv \frac{\dfrac{2N_f}{K_1} + \dfrac{2N_f^2}{K_1K_2}}{1 + \dfrac{2N_f}{K_1} + \dfrac{N_f^2}{K_1K_2}}$$

The fractional saturation was also fitted to the logarithmic form of the Hill equation to obtain values for the Hill coefficient (n) and free NAD concentration at half-saturation ($N_{f0.5}$):

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}\right) = n \times \log N_f - \log N_{f0.5}{}^n$$

The plot of $\log[\bar{Y}/(1 - \bar{Y})]$ versus $\log N_f$ is a straight line with a slope of n. When $\log[\bar{Y}/(1 - \bar{Y})] = 0$, the corresponding position on the $\log N_f$ axis gives $\log N_{f0.5}$. Both the Hill coefficient (n) and the ratio of the dissociation constants (K_2/K_1) measured the degree of cooperative interaction of the binding sites of the mutant in the study. There is negative, no, or positive cooperativity if $K_2/K_1 > 1$, $K_2/K_1 = 1$, or $K_2/K_1 < 1$, respectively. There is negative, no, or positive cooperativity if $n < 1$, $n = 1$, or $n > 1$, respectively. At the upper limit, n is equal to 2.

RESULTS

Molecular Modeling. A total of 26, 10, and 6 intersubunit hydrogen bonds are present in the *P*-axis, *R*-axis, and *Q*-axis interface, respectively (*19*). After careful examination of the three-dimensional structure (*19*, *20*), four interfacial hydrogen bond forming residues were selected among these 42 residues: Asp-186 and Ser-48, which are hydrogen bond partners across the *R*-axis interface, and Glu-276 and Tyr-46, which are hydrogen bond partners across the *Q*-axis interface (Table 1). These four residues share common properties. First, they are highly conserved among the

Table 1: Intersubunit Hydrogen Bonds Formed by Residues Asp-186 and Glu-276 of GAPDH from *B. stearothermophilus* As Described in ref *19*

R-axis interface				*Q*-axis interface			
Arg-13	NH2	Asp-186	O	Glu-276	OE2	Lys-45	NZ
Ser-48	N	Asp-186	OD2	Glu-276	OE2	Tyr-46	OH
Ser-48	OG	Asp-186	OD1	Lys-45	NZ	Glu-276	OE2
Asp-186	OD2	Ser-48	N	Tyr-46	OH	Glu-276	OE2
Asp-186	OD1	Ser-48	OG				
Asp-186	O	Arg-13	NH2				

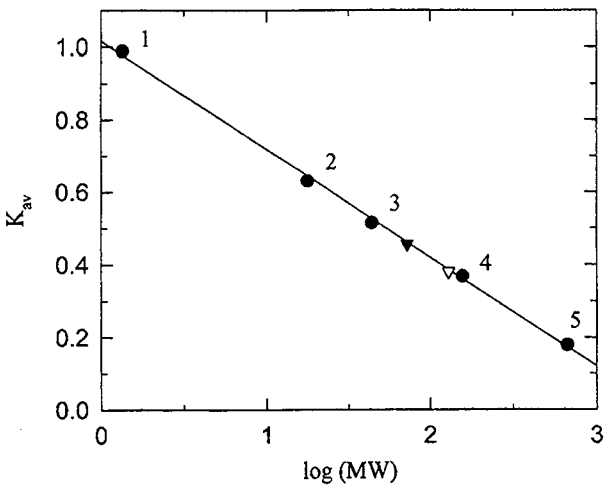


FIGURE 2: Molecular mass determination of mutant GAPDHs from *B. stearothermophilus* by gel filtration on Superose 12. Chromatography was performed at 0.2 mL/min in a Superose 12 FPLC column (Pharmacia) equilibrated with buffer A containing 150 mM KCl (see Materials and Methods). Molecular mass standards vitamin B_{12}, myoglobin, ovalbumin, γ-globulin, and tyroglobulin are represented (●) by a number from 1 to 5, respectively. Data for dimeric double mutants D186G/E276G and Y46G/S48G (▼) and tetrameric single mutants and wild type GAPDHs (▽) are also indicated.

GAPDHs from different species. Second, they all are located in loops. Tyr-46 and Ser-48 are located in the loop following helix α_c, in the cofactor domain. Asp-186 is located in a loop called S-loop (*19, 20*), which extends from residue 179 to 201, and Glu-276 is located in the loop following strand β_5, in the catalytic domain. All of the mentioned residues were replaced with glycine, which was expected to minimize conformational alterations of the loops.

Purification and Characterization of the GAPDH Mutants. All single and double mutants were expressed in *E. coli*, purified, and characterized. During the purification, the behavior of GAPDH mutants was similar to that of wtGAPDH except for the hydrophobic chromatography step. Dimeric and tetrameric enzymes were eluted with 200 and 600 mM ammonium sulfate, respectively. All mutant GAPDHs preserved secondary structure characteristics present in the wtGAPDH, judging by far-UV circular dichroism spectra (data not shown).

As expected, wtGAPDH was tetrameric. Under the experimental conditions, all GAPDH single mutants D186G, E276G, Y46G, and S48G were also tetrameric at as low an oligomer concentration as 0.1 μM. Molecular mass determination by size-exclusion chromatography using a Superose 12 column gave a similar K_{av} of 0.38 for mutants and wtGAPDH (Figure 2) corresponding to a molecular mass of 129 ± 11 kDa, values in good agreement with the theoretical value of 144 kDa. Double mutants D186G/E276G and Y46G/S48G were dimeric for a dimer protein concentration of up to 350 μM, with a K_{av} of 0.45 corresponding to a molecular mass of 72 ± 4 kDa (Figure 2). Centrifugation in sucrose density gradients confirmed the results of gel filtration experiments; Svedberg coefficients of 7.96 and 4.25 S were obtained for tetrameric and dimeric GAPDHs, respectively. Apo and holo forms of wtGAPDH were used as standards. Addition of coenzyme or one of the substrates did not change the oligomerization state of the enzymes: both double mutants D186G/E276G and Y46G/S48G remained dimeric even in the presence of a 50-fold excess of NAD or inorganic phosphate.

Table 2: Steady State Kinetic Parameters for Each Substrate of Mutant GAPDHs from *B. stearothermophilus*[a]

	NAD K_M (mM)	G3P K_M (mM)	P_i K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})
wild type	0.05	1.1	37	65
D186G	0.33	1	18	2
E276G	0.07	0.9	7	72
D186G/E276G		no detectable activity[b]		
Y46G	0.23	0.8	8	87
S48G	0.04	1	7	20
Y46G/S48G		no detectable activity[b]		

[a] The k_{cat} and K_M values were determined at saturating concentrations of all other substrates (see Materials and Methods) and expressed in terms of each subunit. The standard deviation is <20%. [b] No detectable activity means activity of $<10^{-3}$ s^{-1}.

Kinetic Properties of the GAPDH Mutants. Both single mutants D186G and E276G were enzymatically active with K_M values for NAD of 0.33 and 0.07 mM, respectively. Activity of E276G was similar to that of the wild type, whereas Asp-186 substitution with a glycine resulted in a 32-fold decrease in the k_{cat} (Table 2). Double mutant D186G/E276G was inactive under all the conditions that were employed, even at as high a dimer concentration as 40 μM. To investigate the result of mutations themselves on kinetic properties, we obtained and characterized variants of the hydrogen bond-partnered residues across *R*- and *Q*-axis interfaces. Single mutants Y46G and S48G led to active tetramers with K_M values for NAD of 0.23 and 0.04 mM, respectively. The k_{cat} of Y46G was similar to that of the wild type, while the k_{cat} of S48G was only 3 times lower than that of the wild type enzyme. Double mutant Y46G/S48G led to an inactive dimer, like double mutant D186G/E276G. The fact that K_M values for NAD of both single mutants D186G and Y46G are 6- and 5-fold greater than that for wtGAPDH, respectively, whereas values of microscopic dissociation constants K_1 and K_2 (see below) are lower than that of wtGAPDH, remains to be explained.

NAD Binding to Wild Type and GAPDH Mutants. The *B. stearothermophilus* GAPDH contains two tryptophan residues at positions 84 and 310 (*35*). Due to its positioning in the active site of the enzyme and on the basis of phosphorescence studies (*36*), Trp-310 is believed to be the higher emitting fluorescence probe. As reported previously (*11*), NAD binding resulted in quenching of the tryptophan fluorescence. UV–visible absorption and emission fluorescence spectra of native and mutant GAPDH apoenzymes were similar (curves not shown), and the maximum of the emission spectra corresponded to 330 nm. First, we studied NAD binding to dimeric mutants D186G/E276G and Y46G/

Table 3: NAD Microscopic Dissociation Constants of Wild Type and Mutant GAPDHs[a]

	K_1 (μM)	K_2 (μM)	K_2/K_1
wild type	0.060 ± 0.014	0.25 ± 0.02	4
D186G/E276G	5.20 ± 0.43	1.51 ± 0.16	0.29
Y46G/S48G	5.54 ± 0.60	1.43 ± 0.14	0.26
D186G	0.040 ± 0.008	0.090 ± 0.001	2.25
E276G	0.052 ± 0.010	0.40 ± 0.08	8
Y46G	0.015 ± 0.002	0.12 ± 0.01	8
S48G	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01	1.27

[a] Binding experiments and data analysis were performed as indicated in Materials and Methods. Microscopic dissociation constants were expressed as means ± standard deviations. The enzyme concentration was 2.70, 1.35, and 0.4 μM for wtGAPDH, dimeric double mutants, and tetrameric single mutants, respectively. The buffer was 50 mM Tris/HCl (pH 8.0).

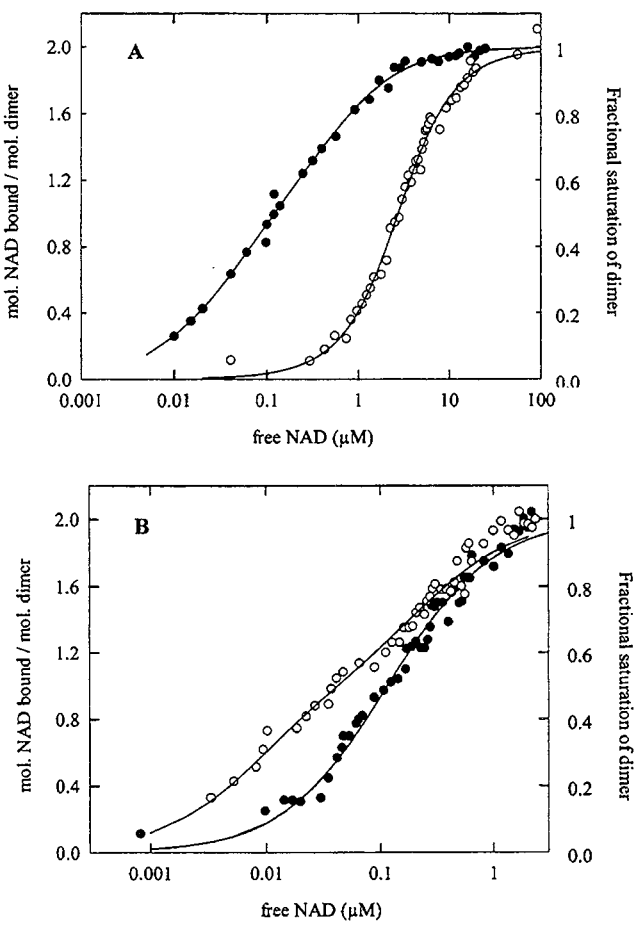


FIGURE 3: NAD binding curves of wild type and mutant GAPDHs. The molar ratio of NAD bound per mole of dimer was plotted against free NAD concentration, for the wild type and mutant enzymes. The corresponding value of fractional saturation of dimers ($\bar{Y}$) is indicated on the second y-axis. Experimental values were calculated from corresponding values of corrected fluorescence as indicated in Materials and Methods. Solid lines represent theoretical curves plotted with the dissociation constants listed in Table 3: (A) wild type enzyme (●) and dimeric double mutant D186G/E276G (○) and (B) tetrameric single mutants S48G (●) and Y46G (○).

S48G. For both dimers, NAD binding isotherms required at least two interacting binding sites for the best fit. Both dimeric mutants D186G/E276G and Y46G/S48G exhibited positive cooperativity for NAD binding with approximately the same K_2/K_1 of around 0.3 (Table 3 and Figure 3) and Hill coefficient of around 1.3 (Table 4 and Figure 4).

Table 4: Hill Coefficients and Free NAD Concentrations at Half-Saturation of Wild Type and Mutant GAPDHs[a]

	Hill coefficient (n)	free NAD concentration at half-saturation ($N_{f0.5}$)
wild type	0.66 ± 0.07	0.12 ± 0.02
D186G/E276G	1.28 ± 0.13	2.80 ± 0.30
Y46G/S48G	1.31 ± 0.15	2.80 ± 0.30
D186G	0.82 ± 0.08	0.06 ± 0.01
E276G	0.54 ± 0.07	0.14 ± 0.02
Y46G	0.53 ± 0.03	0.04 ± 0.01
S48G	0.94 ± 0.20	0.11 ± 0.01

[a] Binding experiment data are the same as those used in Table 3. Data analysis was performed as indicated in Materials and Methods. Hill coefficients and free NAD concentrations were expressed as means ± standard deviations.

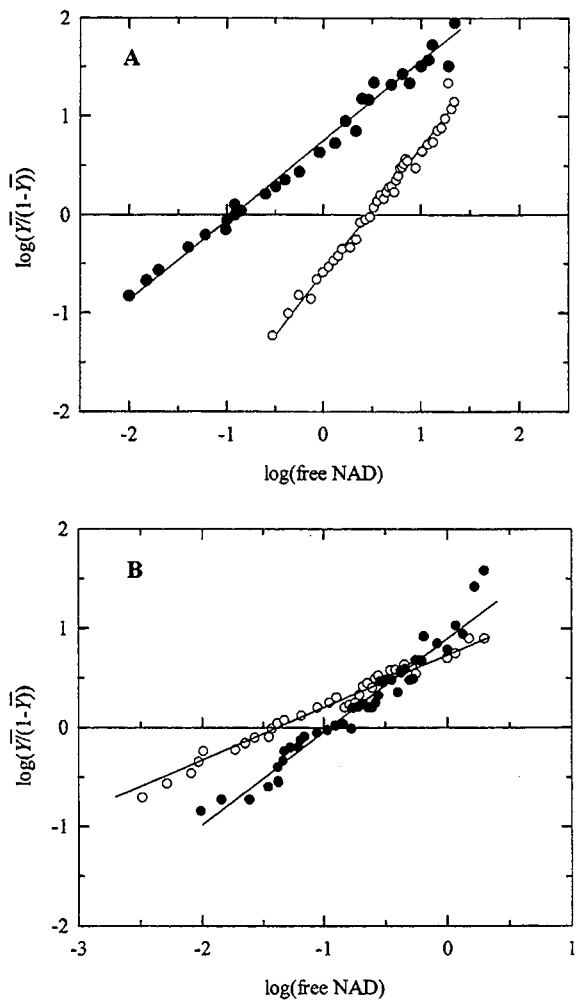


FIGURE 4: Hill plot of the NAD binding to wild type and mutant GAPDHs. The logarithmic form of the Hill equation, log[$\bar{Y}$/(1 − $\bar{Y}$)] was plotted vs the logarithm of free NAD concentration. Experimental values were calculated from the corresponding available values of fractional saturation of dimers ($\bar{Y}$) and free NAD concentration. Solid lines represent theoretical curves plotted with Hill coefficients and free NAD concentrations at half-saturation listed in Table 4: (A) wild type enzyme (●) and dimeric double mutant D186G/E276G (○) and (B) tetrameric single mutants S48G (●) and Y46G (○).

Under the same experimental conditions, negative cooperativity was found for NAD binding to the tetrameric wtGAPDH, as previously reported (*11*). However, NAD binding to wtGAPDH could be adequatly described in terms of independent dimers with only two interacting binding sites

Table 5: Intensity of the Absorption Band, Centered at 360 nm, of the Binary Enzyme–NAD Complex[a]

	$\epsilon_{360,monomer}$ of the binary enzyme–NAD complex (M^{-1} cm^{-1})
wild type	1000 ± 75
D186G	892 ± 52
E276G	900 ± 45
Y46G	840 ± 37
S48G	870 ± 32
D186G/E276G	79 ± 9
Y46G/S48G	90 ± 11

[a] Differential spectroscopic measurements were carried out at 25 °C with two matched double-compartment cells. Enzyme concentrations were 80 μM in subunits for both tetrameric and dimeric GAPDHs.

(Table 3). This was also the case for all tetrameric single mutants. Tetrameric single mutants D186G, E276G, and Y46G exhibited negative cooperativity in binding the coenzyme NAD, while no significant cooperativity was detected for tetrameric single mutant S48G (Figures 3 and 4). Moreover, on the basis of the comparison of the K_2/K_1 ratios, negative cooperativity of Y46G and E276G mutants was more pronounced while that of the D186G mutant was less pronounced compared to that of the wild type enzyme. Hill coefficient values of GAPDH mutants were consistent with the degree of negative cooperativity deduced from the K_2/K_1 ratio (Table 4). The fact that the S48G mutant did not exhibit significant cooperativity in binding the coenzyme NAD remained to be explained. The free NAD concentration at half-saturation ($N_{f0.5}$) deduced from a Hill plot is indicative of NAD affinity. The $N_{f0.5}$ values of D186G and Y46G mutants were 2- and 3-fold higher than that of the wild type, respectively, while those of the S48G and E276G mutants were similar to that of the wild type enzyme. The free NAD concentration at half-saturation for both dimeric mutants D186G/E276G and Y46G/S48G was 23-fold lower than for wtGAPDH.

Absorption Band of the Binary Enzyme–NAD Complex. The absorption band, centered at 360 nm, has been interpreted as a charge transfer between the positive charge of the pyridinium ring of NAD and the negative charge of the thiolate ion of essential Cys-149 (*30*). Its intensity is indicative of the relative positioning (distance and/or orientation) of the two moieties. Tetrameric mutants and wild type GAPDHs gave similar intensities of the absorption band under full saturation with NAD, whereas dimers exhibited a 10–12-fold lower intensity (Table 5). Addition of 1,3-dPG to all of the variant or wild type enzymes saturated with NAD led to a total disappearance of the absorption band. Addition of G3P to the binary enzyme–NAD complex resulted in disappearance of the absorption band for all dimeric GAPDHs. The latter could not be carried out with tetrameric enzymes because of the interference due to the formation of the NADH.

DISCUSSION

Two models were used to describe both negative and positive cooperativity in GAPDHs. The preexisting asymmetry model is based on the asymmetry of the oligomeric enzyme and nonequivalent interactions between subunits. Cooperativity rises as a result of the preferential presence of both asymmetric and symmetric conformations and binding of the ligand to these conformations. The induced-fit model requires symmetric conformations for enzymes both unliganded and fully saturated with NAD enzymes, but allows asymmetric conformations for partially ligated enzyme. Ligand binding sequentially induces a conformational change of the bound subunit, giving rise to structural rearrangements of intersubunit contacts with the unliganded monomers and resulting in the observed cooperative effect. The interpretation of the crystallographic data obtained with lobster muscle GAPDH (*37*) showed potential asymmetry of the subunits, thus supporting the model with preexisting asymmetry. More recently, studies carried out with the insulin hexamer have demonstrated the applicability of this model (*38*). On the other hand, both crystallographic data (*17*, *19*, *20*) and studies in solution (*11*, *12*) supported the induced-fit model in the case of GAPDH from *B. stearothermophilus*. Indeed, no asymmetry was detected either in the apoenzyme or in the holoenzyme in high-resolution three-dimensional structures of the GAPDH from *B. stearothermophilus* (*19*, *20*). In addition, the tetramer with NAD ligated in a single subunit preserved a conformation very similar to that of the apoenzyme in the unliganded subunits, while the structure of the NAD-bound subunit was almost identical to that of the holoenzyme subunit (*17*). Therefore, we based our analysis of binding data for GAPDH from *B. stearothermophilus* on an induced-fit model.

In the study presented here, we examined the biochemical and catalytic properties of tetrameric and dimeric GAPDH mutants from *B. stearothermophilus* to shed more light on the nature of the intersubunit interactions involved in cooperativity and activity. Detailed analysis of NAD binding to wtGAPDH revealed that this enzyme could be described by a minimum of two dissociation constants. This led us to conclude that the tetramer wtGAPDH consists of two independent NAD binding dimers, as if they were separated in space. This conclusion, combined with the induced-fit model, means that in the free enzyme, all subunits exist in the same conformation. Binding of NAD to one subunit changes the conformation of the neighboring subunit in the same dimer, yet leaves another dimer with an unchanged conformation. All other tetrameric variant GAPDHs, except S48G that did not exhibit significant cooperativity, possessed varied degrees of negative cooperativity in NAD binding and also required a minimum of two dissociation constants to describe the data.

This is not necessarily in contradiction with the previous study (*11*), which determined four dissociation constants for wtGAPDH. It is well accepted that if the data can be described with an equation, then any equation with greater complexity will also describe the data with the same goodness of fit, but with somewhat higher deviations in parameter values. Three out of four constants in the previously published study were characterized with high standard deviations. Moreover, all three of them gave the same microscopic dissociation constant value of 0.29–0.33 μM. This led us to the conclusion that three out of four dissociation constants are redundant, and tetrameric wtGAPDH can be described as two independent dimers with two interacting binding sites in each of the dimers. This is not in contradiction with the three-dimensional structure of the GAPDH from *B. stearothermophilus* which is described as a dimer of dimers (*19*, *20*).

Both dimeric double mutants D186G/E276G and Y46G/S48G exhibited positive cooperativity in NAD binding. The fact that dimeric double mutants retain cooperative behavior indicated that the *O*−*P* dimer is most probably the dimer that is responsible for the NAD binding cooperativity in tetrameric enzymes. As a consequence, we concluded that, first, the *P*-axis interface is essential to transmission of the structural information induced by NAD binding from one subunit to another and, second, the S-loop of the *R*-axis-related subunit is not directly involved in NAD binding cooperativity. These conclusions confirm previous observations, which indicate that the S-loop is rigidly maintained within the tetramer core having the same conformation in the apo- and holoenzyme (*21*). These results also support a previous assumption that the conformational changes induced upon NAD binding to the first subunit are transmitted through the *P*-axis interface from the external strands of the β-sheet of one subunit to the external strands of the catalytic domain β-sheet of the *P*-axis-related subunit (*21*). However, the nature of the mutations could modulate the NAD binding cooperativity of the dimer, as confirmed by another *O*−*P* dimer recently generated by double mutation (N180G/E276G) which exhibited negative cooperativity for NAD binding (O. Roitel, unpublished results). The reasons for the different cooperative behaviors of the wild type enzyme and tetrameric and dimeric mutants remained to be elucidated on the structural level.

Comparison of K_2/K_1 ratios for single mutants showed that residues Ser-48 and Asp-186 are more important for revealing negative cooperativity than residues Tyr-46 and Glu-276. Both pairs are the natural hydrogen bond partners in the wild type enzyme. In addition, mutation of either Ser-48 or Asp-186 resulted in decreased activity, whereas substitution of Tyr-46 and Glu-276 residues led to a slightly increased catalytic efficiency. On the basis of this observation, we conclude that the *P*-axis interface determines cooperativity of the *O*−*P* or *Q*−*R* dimers. However, our studies cannot exclude the possibility that interactions with the neighboring dimer can also stabilize the subunit in an optimal conformation and thus participate in revealing cooperativity.

In tetrameric wtGAPDH, NAD is embedded in a cavity composed of residues from the cofactor domain (residues 1−148 and 312−333), of the N-terminal part of the S-loop of the same subunit (residues 178−182), and of the C-terminal part of the S-loop (residues 186−196) from the *R*-axis-related subunit. In the *O*−*P* dimer, the interaction of the S-loop with the active site of the *R*-axis-related subunit is disrupted, and the S-loop is presumably less structured. This hydrophobic loop is now exposed to the solvent with a subsequent increase in the hydrophobic character of the dimers, as confirmed by hydrophobic chromatography. In the dimers, accessibility of the active site to solvent should be increased, particularly for the adenosine-binding site of NAD. This may explain, first, the lower affinity of the dimeric enzyme for NAD and, second, the suboptimal positioning of the pyridinium ring relative to the thiolate ion of the essential Cys-149, as indicated by the lower intensity of the Racker band. Similar to our results, the N313T mutant of *E. coli* GAPDH has a suboptimal positioning of the pyridinium ring of NAD relative to the essential thiolate group (*21*), and the mutation did not eliminate cooperativity in NAD binding (*10*). In the case of *O*−*P* dimers of *B. stearothermophilus* GADPH, the absorption band of the binary enzyme−NAD complex disappeared after addition of 1,3-dPG or G3P, indicating that a covalent complex between the holoenzyme and G3P or 1,3-dPG was likely formed. However, the absence of catalytic activity demonstrated that these ternary complexes were not catalytically efficient.

Both double mutants D186G/E276G and Y46G/S48G were inactive, whereas all single mutants retained activity. This suggests that the absence of activity is due to the suboptimal position of the S-loop and not due to any single mutation. This has been recently supported by the fact that mutation of Arg-197, which is an intrasubunit hydrogen bond partner of Asp-186 (*19*), to glycine has also led to a mutant GAPDH with very low activity (O. Roitel, unpublished results). Moreover, the suboptimal position of the S-loop should also perturb the efficient positioning of at least three key residues, namely, Thr-179 and Arg-195, which are part of the G3P and P_i binding sites, respectively, and Asn-180, which is involved in NAD binding (*20*). Also, we cannot exclude the possibility of a feasible interaction of the S-loop with the exposed hydrophobic core of the dimer, thus resulting in an unnatural conformation of a corresponding dimer in the tetramer. To discount these explanations, it would be necessary to generate an *O*−*P* dimer with a stabilized S-loop having the same conformation as it has in the tetramer and with an adenosine subsite having the same solvent accessibility as in the tetramer.

ACKNOWLEDGMENT

We are very grateful to Dr. N. Zorn, Dr. H. Rogniaux, and Dr. A. Van Dorsselaer for determining the molecular masses of wild type and mutant GAPDHs and to Dr. E. Duée for helpful discussions. We thank the Service Commun de Biophysicochimie of the University Henri Poincaré Nancy I for allowing us to perform the molecular modeling studies. We also thank E. Habermacher, S. Boutserin, and S. Azza for their very efficient technical help.

REFERENCES

1. Traut, T. W. (1994) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 29*, 125−163.
2. Klotz, I. M., Darnall, D. W., and Langerman, N. R. (1975) in *The Proteins* (Neurath, H., and Hill, R. L., Eds.) pp 293−411, Academic Press, New York.
3. Goodsell, D. S., and Olson, A. J. (1993) *Trends Biochem. Sci. 18*, 65−68.
4. Kirschner, K., Gallego, E., Schuster, I., and Goodall, D. (1971) *J. Mol. Biol. 58*, 29−50.
5. Conway, A., and Khosland, D. E. (1968) *Biochemistry 7*, 4011−4022.
6. Boers, W., Oosthuizen, C., and Slater, E. C. (1971) *Biochim. Biophys. Acta 250*, 35−46.
7. Seydoux, F., Bernhard, S., Pfenninger, O., Payne, M., and Malhotra, O. P. (1973) *Biochemistry 12*, 4290−4300.
8. Kelemen, N., Kellershohn, N., and Seydoux, F. (1975) *Eur. J. Biochem. 57*, 69−78.
9. De Wildjer, J. J. M., Boers, W., and Slater, E. C. (1969) *Biochim. Biophys. Acta 191*, 214−220.
10. Corbier, C., Mougin, A., Mely, Y., Adolph, H. W., Zeppezauer, M., Gerard, D., Wonacott, A., and Branlant, G. (1990) *Biochimie 72*, 545−554.
11. Clermont, S., Corbier, C., Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A. J., and Branlant, G. (1993) *Biochemistry 32*, 10178−10184.

12. Allen, G., and Harris, J. I. (1975) *Biochem. J. 151*, 747–749.
13. Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. (1965) *J. Mol. Biol. 12*, 88–118.
14. Malhotra, O. P., and Bernhard, A. (1968) *J. Biol. Chem. 243*, 1243–1252.
15. Malhotra, O. P., and Bernhard, A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70*, 2077–2081.
16. Khosland, D. E., Nemethy, G., and Filmer, D. (1966) *Biochemistry 5*, 365–384.
17. Leslie, A. G. W., and Wonacott, A. J. (1983) *J. Mol. Biol. 165*, 375–391.
18. Harris, J. I., and Waters, M. (1976) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Ed.) Vol. 13, pp 1–49, Academic Press, New York.
19. Skarzynski, T., Moody, P. C., and Wonacott, A. J. (1987) *J. Mol. Biol. 193*, 171–187.
20. Skarzynski, T., and Wonacott, A. J. (1988) *J. Mol. Biol. 203*, 1097–1118.
21. Duée, E., Olivier-Deyris, L., Fanchon, E., Corbier, C., Branlant, G., and Dideberg, O. (1996) *J. Mol. Biol. 257*, 814–838.
22. Delhaise, P., Bardiaux, M., and Wodak, S. J. (1984) *J. Mol. Graphics 2*, 103–106.
23. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., William, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977) *J. Mol. Biol. 112*, 535–542.
24. Kunkel, T. A., Bebenek, K., and McClary, J. (1991) *Methods Enzymol. 204*, 125–139.
25. Mougin, A., Corbier, C., Soukri, A., Wonacott, A., Branlant, C., and Branlant, G. (1988) *Protein Eng. 2*, 45–48.
26. Laemmli, U. K. (1970) *Nature 227*, 680–685.
27. Corbier, C., Clermont, S., Billard, P., Skarzynski, T., Branlant, C., Wonacott, A., and Branlant, G. (1990) *Biochemistry 29*, 7101–7106.
28. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem. 72*, 248–254.
29. Stancel, G. M., and Gorski, J. (1975) *Methods Enzymol. 36*, 166–176.
30. Racker, E., and Krimsky, I. (1952) *J. Biol. Chem. 198*, 731–743.
31. Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A., Branlant, C., and Branlant, G. (1989) *Biochemistry 28*, 2586–2592.
32. Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J. P., and Branlant, G. (1998) *Eur. J. Biochem. 252*, 447–457.
33. Harrigan, P. J., and Trentham, D. R. (1973) *Biochem. J. 135*, 695–703.
34. Adair, G. S. (1925) *J. Biol. Chem. 63*, 529–545.
35. Branlant, C., Oster, T., and Branlant, G. (1989) *Gene 75*, 145–155.
36. Gabellieri, E., Rahuel-Clermont, S., Branlant, G., and Strambini, G. B. (1996) *Biochemistry 35*, 12549–15559.
37. Moras, D., Olsen, K. W., Sabesan, M. N., Buehner, M., Ford, G. C., and Rossmann, M. G. (1975) *J. Biol. Chem. 250*, 9137–9162.
38. Bloom, C. R., Kaarsholm, N. C., Ha, J., and Dunn, M. F. (1997) *Biochemistry 36*, 12759–12765.

BI9912802

Partie B

Etude de l'équilibre existant entre les deux formes oligomériques, dimère et tétramère, des mutants (N180G-E276G) et Y283V de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

I) Rappels.

Seul l'équilibre existant entre les deux formes oligomériques, dimère et tétramère, des mutants (N180G-E276G) et Y283V de la GAPDH de *B. stearothermophilus* a été étudié car ce sont les seuls mutants à posséder une forme tétramérique suffisamment active pour permettre d'étudier l'équilibre par suivi de l'activité.

I.1) Production et purification.

La production et la purification des deux mutants (N180G-E276G) et Y283V de la GAPDH de *B. stearothermophilus* sont conduites d'une manière strictement identique à celles des autres enzymes mutées. Les deux formes oligomériques en équilibre, l'une dimérique et l'autre tétramérique, d'un même mutant sont isolées par le biais de la chromatographie échangeuse d'anions. Les deux formes oligomériques de chaque mutant sont obtenues en quantités approximativement équivalentes. Lors de la chromatographie hydrophobe, les formes dimériques sont éluées aux alentours de 200 mM de $(NH_4)_2SO_4$ alors que les formes tétramériques sont éluées aux alentours de 600 mM de $(NH_4)_2SO_4$. La forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) et les formes dimériques des deux mutants (N180G-E276G) et Y283V ont été isolées sous forme apoenzyme. Seule la forme tétramérique du mutant Y283V est isolée sous la forme holoenzyme.

I.2) Paramètres cinétiques à l'état stationnaire.

Les formes dimériques de chacun des deux mutants ne possèdent pas d'activité enzymatique décelable (k_{cat} inférieur à 10^{-3} s^{-1}). La forme tétramérique du mutant Y283V présente une activité comparable à celle de l'enzyme de type sauvage alors que la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) possède une activité 3 fois supérieure à celle de l'enzyme de type sauvage, comme indiqué dans le tableau 5 page 76c.

II) Etude des propriétés de l'équilibre dimère-tétramère.

II.1) Cinétique de dissociation de la forme tétramérique.

Les GAPDH mutées (N180G-E276G) et Y283V isolées sous forme tétramérique sont incubées à une température constante, des aliquots sont prélevés au cours du temps et leur activité est mesurée. Une diminution de l'activité au cours du temps est observée et elle est attribuée à la dissociation de la forme tétramérique active en dimère inactif. En effet, la quantité de dimère généré estimée à partir des mesures d'activité correspond à la quantité de dimère généré estimée à partir de l'intégration de la surface des pics du chromatogramme obtenu après filtration sur gel en utilisant la colonne Superose 12 (figure 27 page 94a). Pour chaque enzyme, le logarithme du rapport de l'activité spécifique mesurée à différents temps sur l'activité spécifique initiale est tracé en fonction du temps. Les courbes obtenues peuvent se décomposer en deux parties : une phase de décroissance de $\ln(A/A_0)$ en fonction du temps suivie d'un plateau. La tangente à la partie initiale de la courbe permet de déterminer une constante de vitesse (k_{obs}). La valeur de la constante de vitesse (k_{obs}) est indépendante de la concentration initiale en tétramère (soit $8,5 .10^{-3}$, $4,3 .10^{-2}$, $8,6 .10^{-2}$, $4,3 .10^{-1}$ et 0,9 μM en tétramère) comme attendu pour une réaction de premier ordre, en l'occurence la dissociation de la forme tétramérique active en dimère inactif. La température d'incubation affecte la valeur de la constante de vitesse (k_{obs}) : en effet, à 4°C la valeur de la constante de vitesse (k_{obs}) est diminuée d'un facteur 3 à 7 par rapport à 25°C (figures 28 et 29 pages 94b et c, tableau 12 page 94d). Même à 25°C, la dissociation est un phénomène lent et nécessite d'attendre 24 heures pour atteindre l'équilibre. La présence de NAD en concentration saturante n'affecte pas la valeur de la constante de vitesse (k_{obs}) de dissociation de la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G), les cinétiques des formes apo et apo en présence de NAD 2 mM final étant superposables. Par contre, dans le cas de la forme tétramérique du mutant Y283V, la valeur de la constante de vitesse (k_{obs}) de dissociation de la forme holoenzyme est inférieure à celle de la forme apoenzyme d'un facteur 3 à 5.

II.2) Cinétique d'association de la forme dimérique.

Les GAPDH mutées (N180G-E276G) et Y283V isolées sous forme dimérique sont incubées à une température constante, des aliquots sont prélevés au cours du temps et leur activité est mesurée. Une apparition suivie d'une augmentation de l'activité au cours du temps est observée et

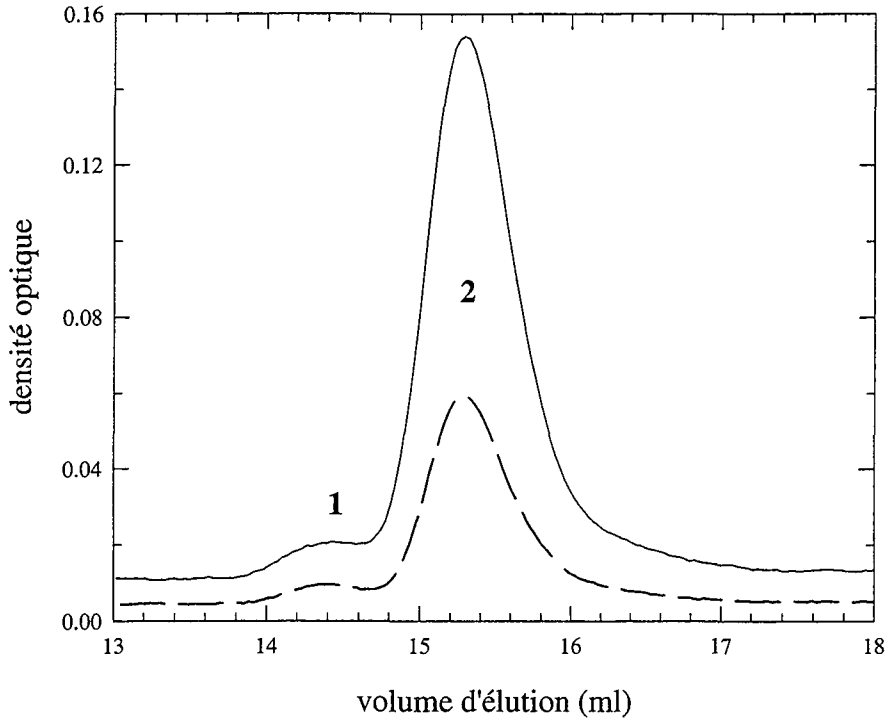


Figure 27 : Chromatogramme de la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) incubée 24 heures à 25°C, obtenu après filtration sur gel (Superose 12).
Les conditions expérimentales utilisées sont décrites dans la partie Matériel et Méthodes page 53. Les lignes continues et pointillées représentent respectivement la densité optique à 280 et 260 nm. Les chiffres 1 et 2 représentent respectivement le pic d'élution (14,4 ml) correspondant à la forme tétramérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) et le pic d'élution (15,3 ml) correspondant à la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G).

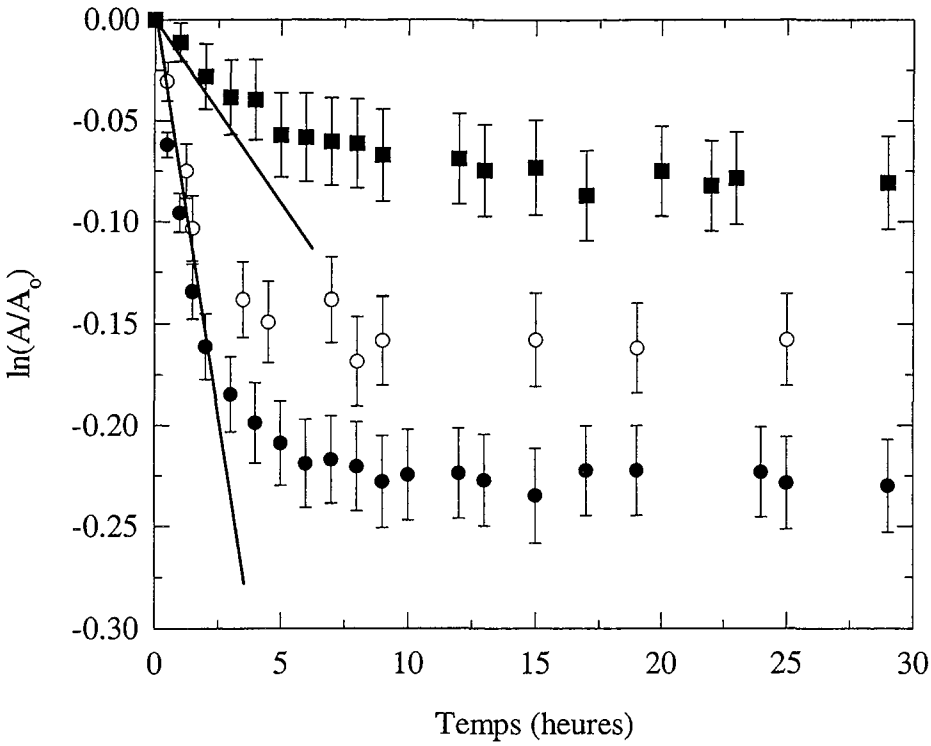


Figure 28 : Représentation logarithmique de la cinétique de dissociation de la forme tétramérique du mutant (N180G-E276G) à 4°C et 25°C suivie par l'activité : cas des formes apo et apo en présence de NAD 2 mM final.

Le logarithme du rapport de l'activité spécifique mesurée sur l'activité spécifique initiale est exprimé en fonction du temps. Les enzymes, à une concentration initiale de 0,04 μM (●) et 0,9 μM (O) en tétramère, sont incubées à 25°C. Les enzymes, à une concentration initiale de 0,04 μM (■) en tétramère, sont incubées à 4°C. Les enzymes sont incubées, à température constante, dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8, β-mercaptoethanol 3 mM final. Les mesures d'activité spécifique sont réalisées en présence de NAD 2 mM final et de G3P 2 mM final. Le pourcentage d'erreur sur chaque mesure, inférieur à 20%, et la tangente à la partie initiale de la courbe sont représentés. Seule la cinétique correspondant à la forme apoenzyme est représentée, les cinétiques pour les deux formes apo et apo en présence de NAD 2 mM final étant superposables.

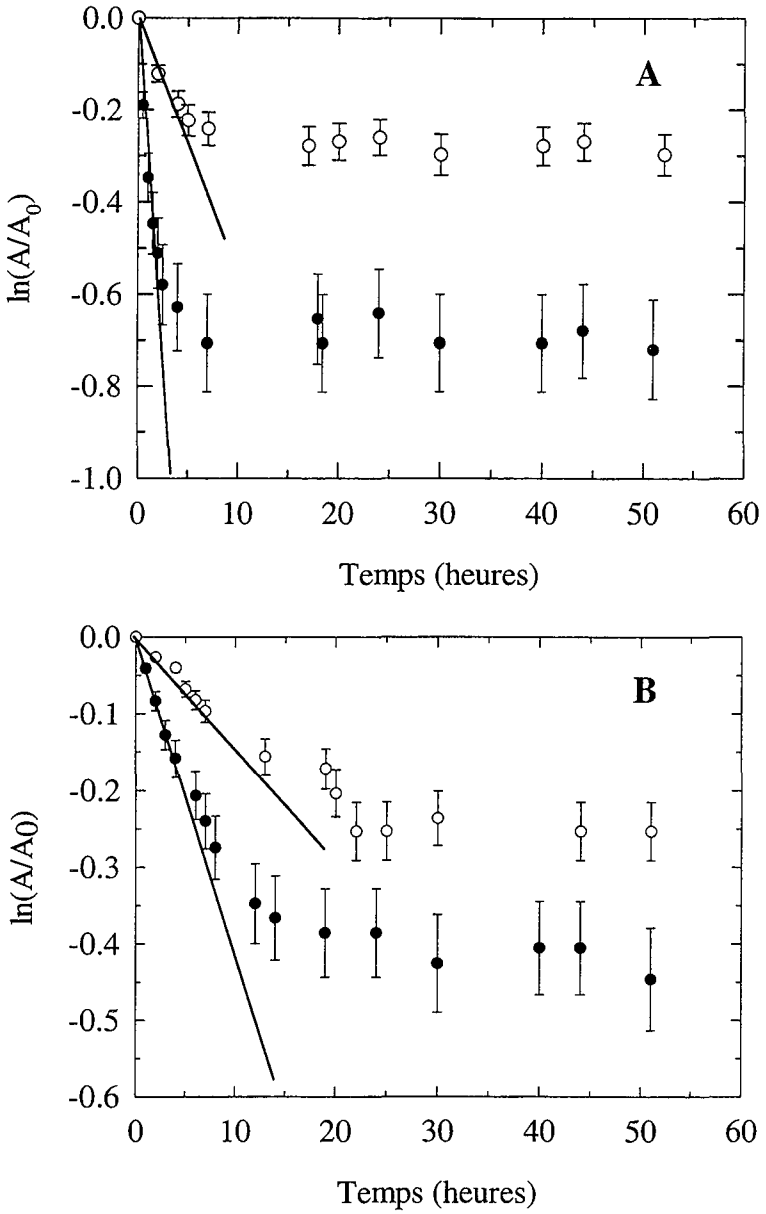


Figure 29 : Représentation logarithmique de la cinétique de dissociation de la forme tétramérique du mutant Y283V à 4°C et 25°C suivie par l'activité : cas des formes apo et holoenzyme.

Le logarithme du rapport de l'activité spécifique mesurée sur l'activité spécifique initiale est exprimé en fonction du temps. Les enzymes sont incubées à 4°C (○) et 25°C (●) dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8 , β-mercaptoethanol 3 mM final et les mesures d'activité sont réalisées en présence de NAD 2 mM final et de G3P 2 mM final dans le tampon Ferdinand (triethanolamine 40 mM, KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0,2 mM, pH 8,9; Ferdinand, 1964). Le pourcentage d'erreur sur chaque mesure, inférieur à 20%, et la tangente à la partie initiale de la courbe sont représentés. Seules les cinétiques correspondant à la concentration initiale en tétramère de 0,04 μM sont représentées.

A : forme apoenzyme du mutant Y283V.

B : forme holoenzyme du mutant Y283V.

Mutation	Température (°C)	k_{obs} (h^{-1})
(N180G-E276G) apo	25	0,082 +/- 0,015
	4	0,014 +/- 0,002
(N180G-E276G) apo + 2 mM NAD	25	0,070 +/- 0,010
	4	0,010 +/- 0,002
Y283V apo	25	0,22 +/- 0,03
	4	0,048 +/- 0,006
Y283V holo	25	0,040 +/- 0,006
	4	0,013 +/- 0,003

Tableau 12 : Constantes de vitesse de premier ordre (k_{obs}) pour la dissociation des formes tétramériques des mutants (N180G-E276G) et Y283V suivie par l'activité.
La constante de vitesse de premier ordre (k_{obs}) représente la pente de la tangente à la partie initiale de la représentation $\ln(A/A_o)$ en fonction du temps, où A représente l'activité spécifique mesurée et A_o l'activité spécifique initiale. Les formes tétramériques des enzymes sont incubées, à température constante, dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8, β-mercaptoethanol 3 mM final. Apo, apo + 2 mM NAD et holo désignent respectivement les formes apo, apo en présence de 2 mM final de NAD et holoenzyme. Les mesures d'activité spécifique sont réalisées en présence de NAD 2 mM final et de G3P 2 mM final.

elle est attribuée à l'association d'une fraction de dimère inactif en tétramère actif. En effet, dans le cas du mutant (N180G-E276G), la quantité de tétramère formé estimée à partir de l'intégration de la surface des pics issus de la chromatographie d'exclusion réalisée avec la colonne Superose 12 correspond à la quantité de tétramère estimée par la mesure de l'activité spécifique en considérant que l'activité spécifique du tétramère formé est identique à celle de la forme tétramérique initiale, soit $k_{cat} = 186\ s^{-1}$.

Le suivi de l'activité au cours du temps dans le cas de la forme dimérique du mutant Y283V n'est pas réalisable car la quantité de tétramère néoformé est trop faible, le plateau d'activité spécifique se situant aux alentours de 2 U/mg.

Pour l'enzyme mutée (N180G-E276G), l'activité est mesurée en fonction du temps et le logarithme du rapport de l'activité spécifique mesurée à différents temps sur l'activité spécifique initiale est tracé en fonction du temps. Les courbes obtenues peuvent se décomposer en deux parties : une augmentation de $\ln(A/A_0)$ en fonction du temps suivie d'un plateau. La tangente à la partie initiale de la courbe permet de déterminer la constante de vitesse (k_{obs}). La valeur de cette constante est indépendante de la concentration initiale en dimère (soit 1,7 , 17, 34 et 68 μM en dimère) (figure 30 et tableau 13 page 95a) suggérant que l'association de la forme dimérique inactive en tétramère actif s'effectue selon une réaction de premier ordre. L'association du dimère inactif en tétramère actif est un phénomène lent qui nécessite une incubation de 24 heures à 25°C pour être sûr d'avoir atteint l'équilibre. La présence de NAD en concentration saturante n'affecte ni la valeur de la constante de vitesse (k_{obs}) d'association du dimère inactif en tétramère actif ni la quantité totale de tétramère formé (figure 30 page 95a), les cinétiques des formes apo et apo en présence de NAD 2 mM final étant superposables.

II.3) Détermination des constantes d'équilibre de dissociation K_{diss}.

Deux méthodes ont été employées en parallèle pour déterminer la constante d'équilibre de dissociation entre la forme tétramérique active et la forme dimérique inactive d'un même mutant. La valeur de la constante d'équilibre est obtenue après traitement des valeurs d'activité spécifique mesurées pour différentes concentrations initiales en tétramère après 24 heures d'incubation à 25°C. Ces mêmes échantillons sont injectés en parallèle sur la colonne de filtration sur gel Superose 12 et les surfaces de chaque pic du chromatogramme, dimère et tétramère, sont intégrées pour aboutir à la valeur de K_{diss} (Manning *et al*, 1996) (voir partie Matériel et Méthodes, page 68). Dans le cas des deux mutants (N180G-E276G) et Y283V, la présence de NAD affecte peu la valeur de la constante d'équilibre. La valeur de la constante d'équilibre déterminée pour la forme apoenzyme du mutant

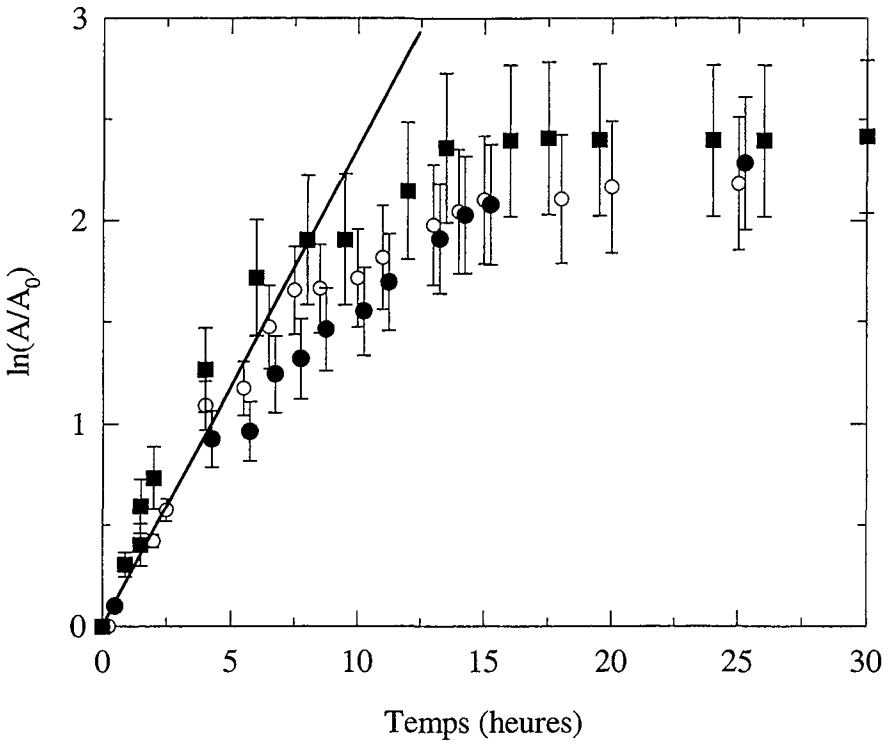


Figure 30 : Représentation logarithmique de la cinétique d'association de la forme dimérique du mutant (N180G-E276G) à 25°C suivie par l'activité : cas des formes apo et apo en présence de NAD 2 mM final.
Le logarithme du rapport de l'activité spécifique mesurée sur l'activité spécifique initiale est exprimé en fonction du temps. Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le tableau ci-dessous. Seule la cinétique de l'apoenzyme est représentée, les cinétiques des deux formes apo et apo en présence de NAD 2 mM final étant superposables. La concentration initiale est de 1,7 (●), 17 (○) et 68 (■) μM en dimère. Le pourcentage d'erreur sur chaque mesure et la tangente à la partie initiale de la courbe sont également représentés.

Mutation	k_{obs} (h^{-1})	Activité spécifique maximale (U/mg)
(N180G-E276G) apo	0,23 +/- 0,04	15 +/- 2
(N180G-E276G) apo + 2 mM NAD	0,18 +/- 0,03	14 +/- 2

Tableau 13 : Constantes de vitesse de premier ordre pour l'association de la forme dimérique du mutant (N180G-E276G) suivie par l'activité.
La constante de vitesse de premier ordre (k_{obs}) représente la pente de la tangente à la partie initiale de la courbe $\ln(A/A_0)$ en fonction du temps, où A représente l'activité spécifique mesurée et A_0 l'activité spécifique initiale. Les formes dimériques des enzymes sont incubées à 25°C dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8, β-mercaptoethanol 3 mM final. Les mesures d'activité sont réalisées à 25°C en présence de NAD 2 mM final et de G3P 2 mM final. Apo et apo + 2 mM NAD désignent respectivement les formes apo et apo en présence de NAD 2 mM final.

Y283V (K_{diss} = 15 μM) est 13 fois plus élevée que celle de la forme apoenzyme du mutant (N180G-E276G) et la valeur de la constante d'équilibre déterminée pour la forme holoenzyme du mutant Y283V (K_{diss} = 9,2 μM) est 6 fois plus élevée que celle de la forme apoenzyme du mutant (N180G-E276G) en présence de NAD 2 mM final (figures 31 et 32 pages 96a et b, tableau 14 page 96a). Seule la valeur de la constante d'équilibre de dissociation du mutant Y283V, sous forme apo et holoenzyme, déterminée par mesure de l'activité spécifique a pu être confirmée par la valeur de K_{diss} déterminée à partir de l'intégration de la surface des pics du chromatogramme obtenu par chromatographie d'exclusion (figure 33 page 96c). Dans le cas de la GAPDH mutée (N180G-E276G), les surfaces des pics du chromatogramme, dimère et tétramère, correspondant à la chromatographie d'exclusion réalisée avec la colonne Superose 12 sont trop peu différentes d'une concentration initiale en tétramère à l'autre pour permettre la détermination de K_{diss} par cette méthode. Cela indique tout de même que la valeur de K_{diss} du mutant (N180G-E276G) doit être inférieure à celle du mutant Y283V.

II.4) Etude de la réversibilité de l'équilibre dimère-tétramère.

A partir de la valeur de K_{diss} de la forme apoenzyme du mutant (N180G-E276G) déterminée par mesure de l'activité en fonction de différentes concentrations initiales en tétramère actif, nous avons calculé la quantité totale de tétramère théoriquement formé lorsque l'association du dimère inactif en tétramère actif atteint l'équilibre. Les calculs réalisés à partir des mesures d'activité et de l'intégration de la surface des pics du chromatogramme correspondant à la chromatographie d'exclusion réalisée avec la colonne Superose 12 montrent que seulement 6% du total de tétramère théoriquement attendu est formé au cours de la réaction d'association du dimère inactif en tétramère actif. Cela met donc en évidence l'absence apparente d'une réversibilité totale de l'équilibre. Le fait que l'équilibre ne soit pas totalement réversible a été confirmé par des expériences de dilution-reconcentration réalisées à partir de la forme tétramérique purifiée. Pour ce faire, la forme tétramérique de l'enzyme, à une concentration de 7 μM en tétramère, est incubée 24 heures à 25°C puis concentrée, par filtration sur membrane YM30 (Amicon) jusqu'à une DO_{280nm} correspondant à une valeur de 59 μM en tétramère et enfin, de nouveau incubée 24 heures à 25°C. En tenant compte de la valeur de la constante d'équilibre de dissociation K_{diss} de la forme apoenzyme du mutant (N180G-E276G), la comparaison des valeurs d'activité spécifique des solutions diluées et concentrées, à l'équilibre, montre qu'environ seulement 10% de la quantité théorique de tétramère néoformé est effectivement formée. Le même pourcentage de tétramère actif est formé au cours de la réaction d'association du dimère inactif en tétramère actif, que le tétramère provienne

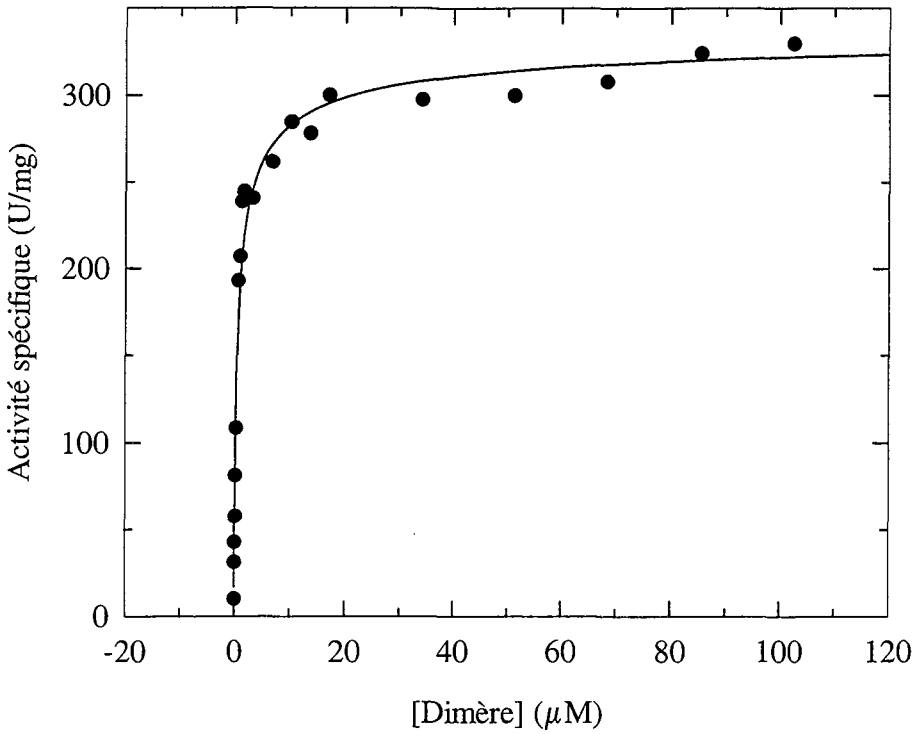


Figure 31 : Détermination de la constante d'équilibre K_{diss} de la forme apoenzyme du mutant (N180G-E276G) par mesure de l'activité spécifique.
Les conditions expérimentales et le traitement des données sont ceux décrits dans le Tableau ci-dessous. [Dimère] représente la concentration totale en enzyme exprimée en dimère.

Mutation	K_{diss} (μM)	Aspémax (U/mg)
(N180G-E276G) apo	1,1 +/- 0,11	337 +/- 7
(N180G-E276G) apo + 2 mM NAD	1,5 +/- 0,33	333 +/- 23
Y283V holo	9,2 +/- 0,09	93 +/- 16
Y283V apo	15 +/- 2,5	90 +/- 6

Tableau 14 : Détermination de la constante d'équilibre K_{diss} par mesure de l'activité spécifique.
Pour chaque concentration initiale en tétramère, l'activité spécifique a été mesurée après une incubation de 24 heures à 25°C dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8, β-mercaptoethanol 3 mM final. L'activité spécifique a été mesurée en présence de NAD 2 mM final et de G3P 2 mM final et les données sont ensuite traitées comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes page 68. Aspémax représente l'activité spécifique maximale.

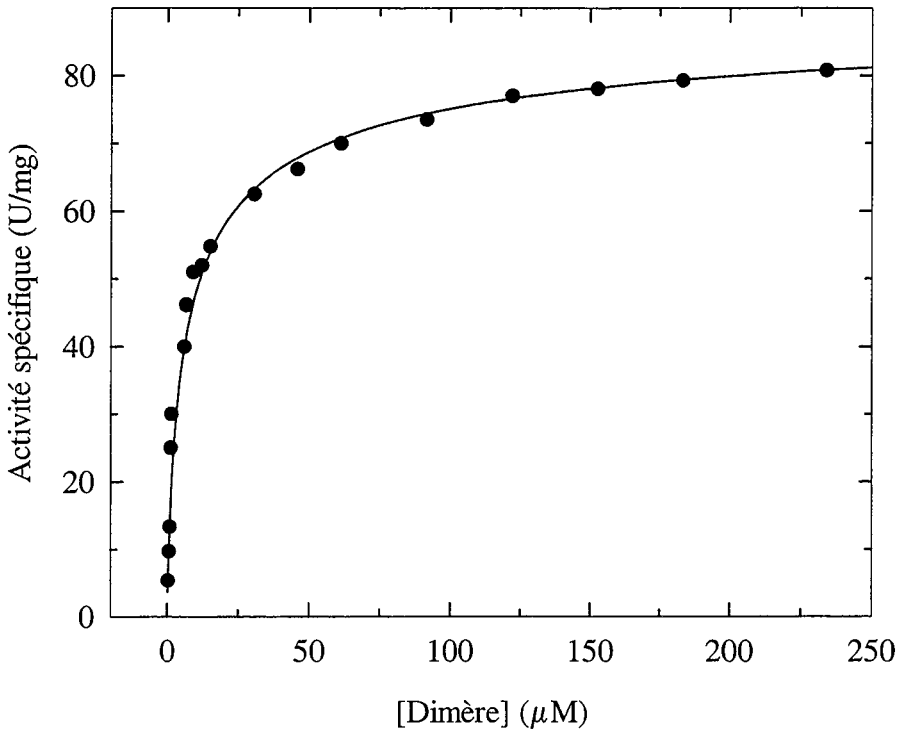


Figure 32 : Détermination de la constante d'équilibre K_{diss} de la forme holoenzyme du mutant Y283V par mesure de l'activité spécifique.
Pour chaque concentration initiale en tétramère, l'activité spécifique a été mesurée après une incubation de 24 heures à 25°C dans le tampon Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8, β-mercaptoethanol 3 mM final. L'activité spécifique a été mesurée en présence de NAD 2 mM final et de G3P 2 mM final et les données sont ensuite traitées comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes page 68. [Dimère] représente la concentration totale en enzyme exprimée en dimère.

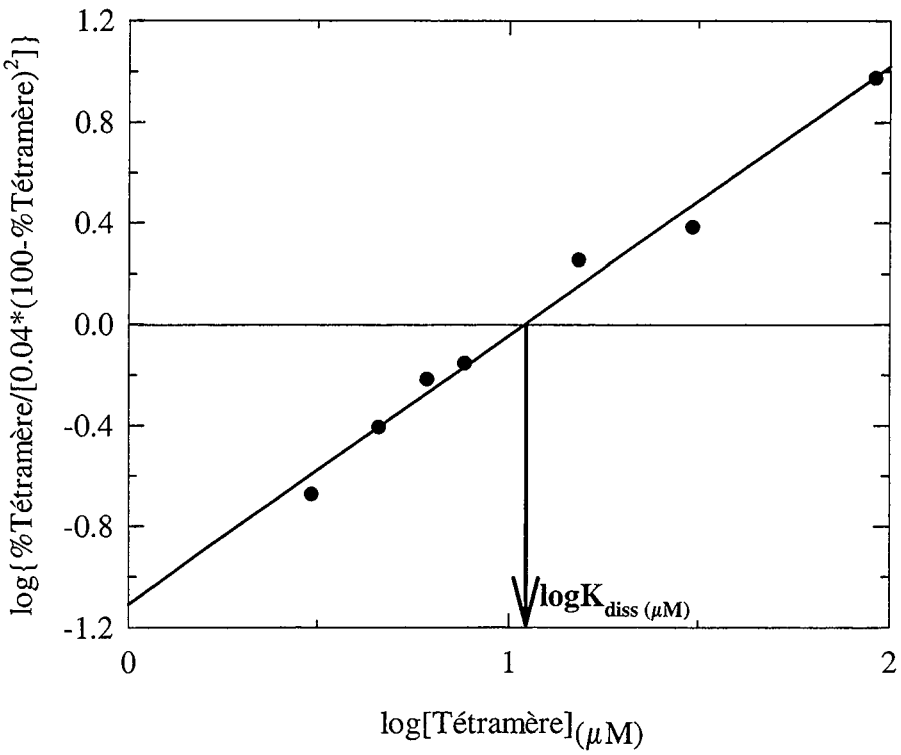


Figure 33 : Détermination de la constante d'équilibre K_{diss} de la forme holoenzyme du mutant Y283V par chromatographie d'exclusion réalisée avec la colonne Superose 12 couplée au système FPLC (Manning *et al*, 1996).

Les échantillons utilisés ici sont ceux qui ont servi à la détermination de la constante d'équilibre K_{diss} par mesure de l'activité. Les surfaces de chaque pic sont intégrées à l'aide du logiciel FPLC Director (Pharmacia) et les données sont ensuite traitées comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes page 69. La flèche indique la valeur de $logKdiss_{(\mu M)}$.

directement de la purification réalisée à partir du culot cellulaire ou qu'il soit isolé après la dissociation de la forme tétramérique initialement purifiée. Cela suggère donc que ni le stockage sous forme de précipité au sulfate d'ammonium suivi d'une dialyse ni les différentes étapes chromatographiques ne sont responsables de l'absence apparente d'une réversibilité totale de l'équilibre. La présence de NAD n'affecte ni la quantité de tétramère actif généré ni la vitesse à laquelle il est généré. L'agrégation ou la précipitation de la protéine ne permet pas non plus d'expliquer l'absence apparente d'une réversibilité totale de l'équilibre. La quantité de protéine précipitée à la fin de l'étape d'association est estimée à environ 10% de la protéine initiale. Pour ce faire, l'enzyme a été incubée 24 heures à 25°C, puis centrifugée pendant 1 heure à 20 000 g et les quantités de protéine présentes dans le surnageant et dans le culot ont été estimées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

DISCUSSION

Au cours de ce travail, des mutations introduites aux interfaces R et Q ont permis de générer des GAPDH mutées produites sous forme strictement dimérique ou sous deux formes dimère et tétramère en équilibre.

Les études enzymatiques, de calorimétrie différentielle et d'extinction de fluorescence ont montré que la plupart des GAPDH mutées générées conservaient des propriétés de coopérativité pour la fixation du cofacteur et présentaient une stabilité thermique plus faible. Elles ont aussi montré que les formes dimériques ne présentaient aucune activité enzymatique et que la forme dimérique inactive des GAPDH mutées, produites sous deux formes dimère et tétramère en équilibre, n'était apparemment pas capable de retrouver l'activité théorique attendue.

Cependant, il reste à valider certaines des interprétations avancées dans ce mémoire et à mettre en œuvre d'autres méthodes permettant d'interpréter certains des résultats expérimentaux obtenus.

- le dimère formé est-il bien de type O-P ?
- pour quelles raisons les GAPDH produites sous forme dimérique sont-elles inactives ?
- comment peut-on expliquer les différentes propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur observées et les relier à la structure des différentes GAPDH mutées ?
- comment interpréter le fait que les GAPDH produites sous forme dimérique possèdent une stabilité thermique plus faible que l'enzyme de type sauvage ou que la forme tétramérique mutée correspondante ?
- et enfin, comment expliquer que lors de l'expérience de réassociation de la forme dimérique de la GAPDH mutée, en équilibre dimère-tétramère, la réversibilité ne soit apparemment que partielle ?

I) Le dimère formé est de type O-P.

Comme déjà mentionné, la GAPDH de *B. stearothermophilus* est un homotétramère, on peut donc générer 3 types de dimères, à savoir : les dimères de type O-P (où les sous-unités sont symétriques par rapport à l'axe P), les dimères de type O-R (où les sous-unités sont symétriques par rapport à l'axe R) et les dimères de type O-Q (où les sous-unités sont symétriques par rapport à l'axe Q).

Dans notre étude nous avons supprimé des liaisons H s'établissant à travers les deux interfaces R et Q et, à cause du plus grand nombre de contacts interatomiques s'établissant le long de l'interface P et du plus petit nombre de résidus hydrophobes exposés au solvant dans le cas du

dimère de type O-P, la formation de ce dimère est la plus probable. Il doit être, de plus, le plus stable. Un autre argument indiquant que nous avons très probablement généré un dimère de type O-P est que la GAPDH produite sous forme dimérique dans le cas du mutant D186G-E276G possède une meilleure affinité pour le NADP que pour le NAD à l'inverse de l'enzyme tétramérique de type sauvage. En effet, dans la GAPDH de type sauvage, la très faible affinité pour le NADP, comparée à celle pour le NAD, a pu être attribuée à la conjugaison de 2 facteurs (Skarzynski *et al*, 1987 ; Corbier *et al*, 1990b ; Clermont *et al*, 1993 ; Didierjean *et al*, 1997) :

1) à un encombrement stérique plus important du NADP lié à la présence du groupement phosphate en 2' du ribose adjacent à l'adénine et qui, par la présence des chaînes latérales des résidus Leu187 et Pro188 de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe R, conduit à une fixation non efficace du NADP.
2) à la répulsion électrostatique entre la chaîne latérale de l'Asp32 et le groupement phosphate doublement ionisé en 2' du ribose du NADP.

Dans les dimères de type O-P, du fait de l'absence de l'interface R, les résidus Leu187 et Pro188 de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe R ne peuvent plus jouer le rôle d'antidéterminants structuraux pour la fixation du NADP. Ceci devra être confirmé en mesurant l'affinité relative pour le NAD et le NADP sur d'autres mutants dimériques.

Deux approches pouvaient être utilisées pour prouver de façon irréfutable que les dimères générés étaient bien de type O-P. La première approche consiste à utiliser une sonde protéasique comme par exemple la trypsine. La simulation des profils d'hydrolyse trypsique (non montrés) pour l'enzyme tétramérique et les trois dimères potentiels a montré que les profils ne seraient pas suffisamment différents pour envisager d'utiliser cette approche. La seconde approche consiste à obtenir une structure cristallographique de la GAPDH mutée produite sous forme strictement dimérique. C'est dans ce contexte que nous avons entamé une collaboration avec le groupe de biocristallographie dirigé par le Dr A. Aubry (LCM3B, UPRESA 7036, UHP Nancy I) dans le but de cristalliser la GAPDH mutée (Y46G-S48G-R52G) produite sous forme strictement dimérique. Mais, jusqu'à ce jour, aucun cristal de cette GAPDH mutée n'a pu être obtenu.

II) Rôle de la structure quaternaire dans la stabilité thermique de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

Le suivi de la perte d'activité de la GAPDH en fonction de la température ne pouvant pas être utilisé en raison de l'absence d'activité des GAPDH mutées produites sous forme strictement

dimérique, nous avons employé une autre méthode à savoir la calorimétrie différentielle, pour évaluer la stabilité de ces GAPDH vis-à-vis de la dénaturation thermique. Les valeurs de température de dénaturation (t_{max}) ainsi obtenues indiquent que toutes les GAPDH générées sous forme dimérique ont une stabilité plus faible que la GAPDH tétramérique de type sauvage ou que la forme tétramérique correspondante dans le cas d'une GAPDH mutée produite sous deux formes dimère et tétramère en équilibre. Des études de modélisation moléculaire ont été entreprises en collaboration avec le Dr E. Duée du Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire (IBS, Grenoble) pour tenter de déterminer les causes de la forte baisse de stabilité des dimères de type O-P par rapport aux formes tétramériques. Dans le dimère de type O-P, l'absence d'interaction entre chaque sous-unité composant le dimère et la boucle S de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe R expose au solvant une cavité qui pourrait altérer la stabilité de la GAPDH mutée. A partir des études de modélisation moléculaire menées par le Dr E. Duée, nous avons entrepris de combler ces cavités par des chaînes latérales d'acides aminés appropriés. Pour ce faire, la mutation des résidus suivants a été entreprise T34Q, T39S et L43Q (figure 34, page 100a). Les résidus Thr34, Thr39 et Leu43 sont localisés respectivement dans la boucle reliant le feuillet β_5 à l'hélice α_3 pour le premier et dans l'hélice α_3 pour les deux suivants. La mutation simultanée de ces trois résidus a conduit à une GAPDH mutée produite sous deux formes en équilibre, dimère inactif et tétramère très peu actif (k_{cat} = 0.1 s^{-1}). L'influence de ces mutations sur la stabilité thermique de la forme dimérique de la GAPDH mutée, qui est elle aussi très probablement de type O-P, n'a pas encore été menée. Pour augmenter la stabilité des formes dimériques, une autre approche, complémentaire de la première, pourrait être utilisée : elle consisterait à remplacer certains résidus hydrophobes situés le long des interfaces R et Q et, qui sont maintenant exposés au contact du solvant par des résidus hydrophiles. La modélisation moléculaire concernant cette dernière approche n'a pas encore été menée.

III) Rôle de la structure quaternaire de la GAPDH de *B. stearothermophilus* dans la révélation de l'activité enzymatique.

Pour la réaction enzymatique dans le sens phosphorylation oxydative, en présence de NAD, toutes les GAPDH mutées produites sous forme strictement dimérique et toutes les formes dimériques des GAPDH mutées, produites sous deux formes dimère et tétramère en équilibre, sont inactives alors que toutes les formes tétramériques des GAPDH mutées possèdent une activité

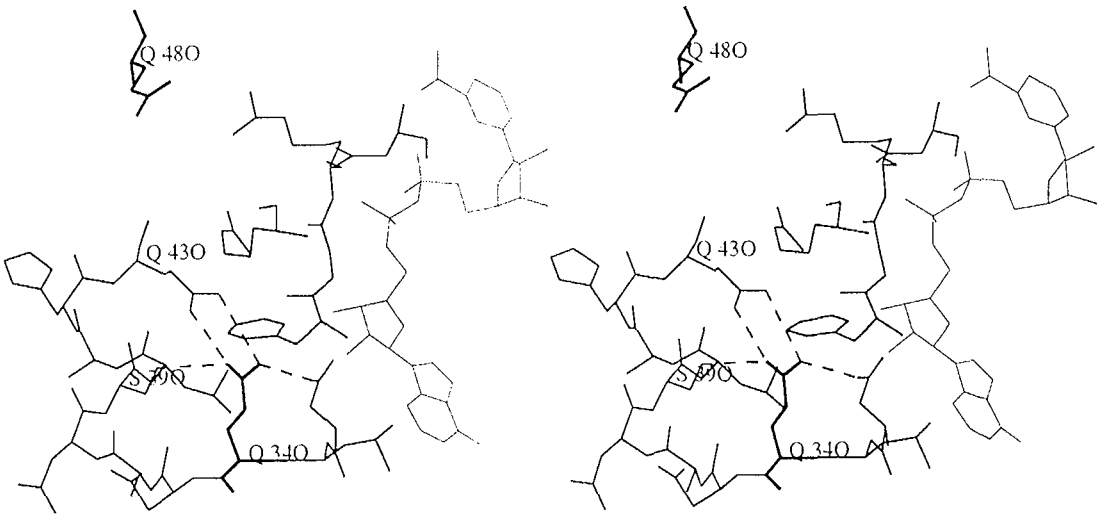


Figure 34 : Vue stéréo des mutations T34Q, T39Q et L43S de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.
La modélisation moléculaire a été réalisée sur une station Silicon Graphics Extreme Indigo^2 avec le programme TURBO-FRODO (Roussel et Cambillau, 1989). Les lignes pointillées représentent les liaisons H.

enzymatique variable suivant les cas. Quels sont les facteurs qui permettent d'expliquer l'absence d'activité des formes dimériques des GAPDH mutées ?

La GAPDH mutée E276G possède un k_{cat} comparable à celui de l'enzyme de type sauvage alors que le k_{cat} de la GAPDH mutée D186G est 32 fois inférieur à celui de l'enzyme de type sauvage. La double mutation des acides aminés Ser48 et Tyr46 qui interagissent respectivement avec les résidus Asp186 et Glu276, via des liaisons hydrogène à travers les interfaces R et Q, conduit à une GAPDH mutée isolée sous forme strictement dimérique et inactive. Ce premier résultat suggérait donc que l'absence d'activité ne correspondait pas à la somme des effets de chaque simple mutation sur le k_{cat}. Une autre double mutation (N180G-E276G) a permis de conforter cette hypothèse. Dans ce cas aussi, les simples mutations conduisent à des GAPDH produites sous forme strictement tétramérique, qui présentent un k_{cat} comparable voire supérieur à celui de l'enzyme de type sauvage mais la GAPDH mutée (N180G-E276G) existe cette fois sous deux formes oligomériques en équilibre, l'une dimérique inactive et l'autre tétramérique trois fois plus active que l'enzyme de type sauvage. Cela suggérait donc très fortement que l'absence d'activité des formes dimériques des différentes GAPDH mutées était indépendante des mutations réalisées et était la conséquence directe de l'état dimérique, probablement due à une modification de la conformation du site actif comparée à celle dans le tétramère.

Dans la GAPDH tétramérique sauvage, le NAD est positionné dans une cavité constituée de résidus du domaine de fixation du cofacteur, de la partie N-terminale de la boucle S de la même sous-unité (résidus 178 à 182) et de la partie C-terminale de la boucle S (résidus 186 à 196) de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *R*. Dans le dimère de type O-P, l'interaction de la boucle S avec la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *R* n'existe plus. De ce fait, la boucle S adopte une conformation différente de celle qu'elle possède dans le tétramère, du fait du caractère hydrophobe de cette boucle qui est maintenant exposée au solvant. Cela pourrait expliquer le positionnement et/ou l'orientation non optimal(e-s) de la partie nicotinamide du NAD par rapport au thiolate essentiel comme l'indique la plus faible intensité de la bande d'absorption centrée à 360 nm du complexe binaire GAPDH-NAD des GAPDH produites sous forme dimérique comparée à celle des GAPDH tétramériques de type sauvage et mutées. Dans le cas des GAPDH mutées (Y46G-S48G) et (D186G-E276G), produites sous forme strictement dimérique et de la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) produite sous deux formes dimère et tétramère en équilibre, la bande d'absorption du complexe binaire GAPDH-NAD disparaît après addition de 1,3dPG ou de G3P, indiquant qu'un complexe covalent entre la forme holoenzyme de la GAPDH et le G3P ou le 1,3dPG est probablement formé. Néanmoins, l'absence d'activité montre que ces complexes covalents ne sont pas efficaces.

Une autre mise en évidence de la modification du site actif de la GAPDH mutée (D186G-E276G) produite sous forme strictement dimérique et de la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) produite sous deux formes dimère et tétramère en équilibre, est fournie par l'étude de la réactivité de la cystéine essentielle avec le 2,2' dithiodipyridine (2PDS). Ces expériences ne peuvent être réalisées que sur les formes apoenzyme des GAPDH. En effet, en présence de NAD, la réactivité de la GAPDH pour le 2PDS est très faible. Seules des cinétiques d'inactivation par l'iodoacétamide en fonction du pH auraient permis de déterminer la réactivité de la cystéine essentielle sur les formes apo et holoenzyme des GAPDH. Mais, comme les GAPDH mutées produites sous forme dimérique sont inactives, nous ne pouvons pas appréhender la réactivité de la cystéine essentielle en présence de NAD, condition qui se rapproche le plus d'un test d'activité. Contrairement à la forme apoenzyme de la GAPDH de type sauvage ainsi qu'à la forme tétramérique et apoenzyme de la GAPDH mutée (N180G-E276G) produite sous deux formes dimère apoenzyme et tétramère apoenzyme en équilibre, la GAPDH mutée (D186G-E276G) produite sous forme apoenzyme strictement dimérique et la forme apoenzyme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) ne forment pas de paire d'ions entre le résidu Cys149 et le résidu His176. La valeur du pK_{app} du résidu Cys149 est de 8,5 au lieu de 5,7 lorsque la paire d'ions est formée (Talfournier, 1998). La valeur élevée du pK_{app} de la Cys149 n'explique pas l'absence d'activité. En effet, dans les conditions de mesure de l'activité à pH 8,9, la cystéine essentielle se trouve sous forme de thiolate et est donc en mesure d'attaquer le C_1 du G3P, si elle est bien positionnée. Dans ces GAPDH mutées produites sous forme dimérique, la réactivité du résidu Cys149 est même 5 fois supérieure à celle mesurée dans la GAPDH de type sauvage et de la forme tétramérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G), suggérant une meilleure accessibilité du résidu Cys149 vis-à-vis du 2PDS, sans doute due à une plus grande distance entre les deux résidus. Il apparaît donc que le site actif des GAPDH produites sous forme dimérique est modifié de telle façon que la distance et/ou l'orientation entre les résidus Cys149 et His176 ne permette plus la formation d'une paire d'ions. Dans l'hypothèse où un intermédiaire covalent est formé, plusieurs cas peuvent être envisagés pour expliquer l'absence de transfert d'hydrure : le transfert d'hydrure du thiohémiacétal vers le C4 du cycle pyridinium n'a pas lieu à cause d'un mauvais positionnement relatif des deux partenaires et/ou à cause de l'absence d'assistance du transfert d'hydrure par le résidu His176 jouant habituellement le rôle de base. L'ensemble des résultats suggère que l'un des facteurs responsables de l'absence d'activité est lié à une conformation non optimale de la boucle S. Cette suggestion a été confortée par la mutation des résidus invariants Arg197 et Asp282 en glycine. La chaîne latérale du résidu Arg197 établit une liaison hydrogène intra sous-unité avec la chaîne latérale du résidu invariant Asp186 qui est situé dans la boucle S et deux liaisons hydrogène

inter sous-unités avec la chaîne latérale du résidu Asp282 de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *P*. La chaîne principale du résidu Asp282 établit, quant à elle, une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu Arg52 de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *Q*. Les deux mutations R197G et D282G conduisent à une GAPDH mutée produite sous deux formes oligomériques en équilibre : une forme dimérique inactive et une forme tétramérique très peu active. Cela suggère donc que le positionnement optimal de la boucle S serait en partie assuré par des liaisons hydrogène s'établissant entre des résidus appartenant à la boucle S. Chez la GAPDH sauvage de *B. stearothermophilus*, la conformation de la boucle S est aussi stabilisée par une liaison hydrogène intra sous-unité s'établissant entre les chaînes latérales des résidus Asp181 et His190 et à une liaison ionique s'établissant entre les chaînes latérales des résidus Asp181 et Arg195. Le positionnement non optimal de la boucle S devrait aussi perturber le positionnement efficace d'au moins trois résidus clés, à savoir : les résidus Thr179 et Arg195 qui constituent respectivement une partie du site de fixation du groupement phosphate du G3P (site Ps) et du phosphate inorganique (site Pi) et le résidu Asn180 qui établit une liaison hydrogène avec l'oxygène du pyrophosphate du NAD. Pour confirmer ces hypothèses, il serait nécessaire d'une part de vérifier si les vitesses des étapes d'acylation et de phosphorolyse sont altérées et, d'autre part, de générer un dimère de type O-P dans lequel la boucle S serait stabilisée dans la même conformation que celle qu'elle adopte dans la GAPDH tétramérique de type sauvage et où le sous-site de l'adénosine présenterait la même accessibilité au solvant que dans la GAPDH tétramérique de type sauvage. Des études de modélisation moléculaire ont été menées par le Dr E. Duée suggérant que le remplacement du résidu Ile204 par un résidu glutamine permettrait de former un réseau de liaisons hydrogène entre les chaînes latérales des résidus Gln182, Arg194, Arg197 et Ile204, qui stabiliserait la boucle S dans une conformation très proche de celle qu'elle possède à l'intérieur du tétramère (figure 35 page 103a). Ce mutant est en cours de réalisation.

IV) Rôle de la structure quaternaire de la GAPDH de *B. stearothermophilus* dans la coopérativité de fixation du cofacteur.

Nous avons examiné les propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur des différentes GAPDH mutées produites sous forme dimérique et/ou tétramérique dans le but d'obtenir plus d'informations sur la nature des interactions inter sous-unités impliquées. Nos résultats montrent

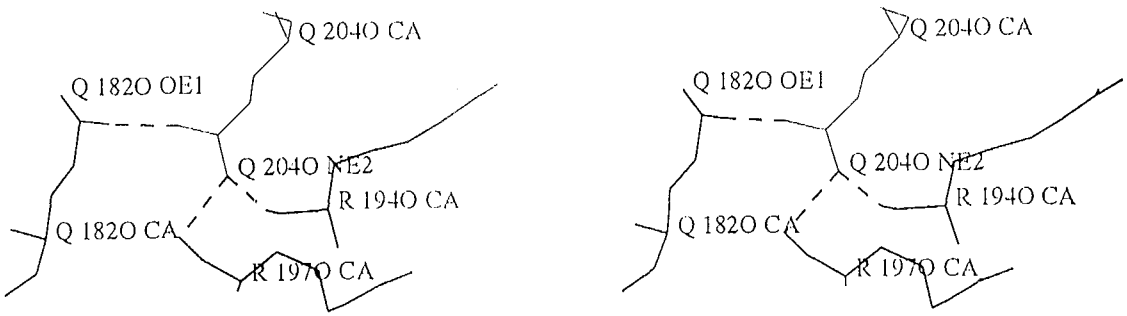


Figure 35 : Vue stéréo de la mutation Ile 204 de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.
La modélisation moléculaire a été réalisée sur une station Silicon Graphics Extreme Indigo^2 avec le programme TURBO-FRODO (Roussel et Cambillau, 1989). Les lignes pointillées représentent les liaisons H.

que la fixation du NAD par la GAPDH de type sauvage peut être décrite par un modèle à au moins deux constantes de dissociation. Nous en avons conclu que la GAPDH tétramérique de type sauvage est en fait constituée de deux dimères indépendants qui fixent le NAD. Combiné avec le modèle de l'asymétrie induite ou « KNF », cela signifie qu'en absence de NAD toutes les sous-unités de la GAPDH possèdent la même conformation. La fixation du NAD par la première sous-unité induit un changement de conformation de la sous-unité voisine à l'intérieur du même dimère tandis que la conformation de l'autre dimère reste inchangée. Toutes les GAPDH mutées produites sous forme strictement tétramérique possèdent une coopérativité négative plus ou moins marquée pour la fixation du NAD, à l'exception des GAPDH mutées S48G et N180G qui présentent respectivement une absence de coopérativité significative et une coopérativité positive. La forme tétramérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) produite sous deux formes dimère et tétramère en équilibre possède, quant à elle, une coopérativité négative peu marquée pour la fixation du NAD. La description de la fixation du NAD par ces GAPDH mutées nécessite également un minimum de deux constantes de dissociation. Nos résultats ne sont pas nécessairement en contradiction avec une étude précédente (Clermont *et al*, 1993), où quatre constantes de dissociation avaient été déterminées pour la GAPDH de type sauvage. Il est bien admis que si des données sont décrites avec une équation à N paramètres, elles peuvent l'être aussi avec une équation plus complexe, c'est-à-dire avec plus de N paramètres, sans modifier l'allure de l'ajustement des points expérimentaux par la courbe théorique mais avec un pourcentage d'erreur sur les valeurs des paramètres plus important. Parmi les quatre constantes de l'étude précédente (Clermont *et al*, 1993), trois d'entre elles ont été déterminées avec un fort pourcentage d'erreur. De plus, les valeurs de ces trois constantes de dissociation microscopiques sont similaires, étant comprises entre 0,29 et 0,33 μM. Nous en avons donc conclu que ces trois constantes de dissociation étaient redondantes et que la GAPDH tétramérique de type sauvage pouvait être décrite sous la forme de deux dimères indépendants, chaque dimère présentant une coopérativité pour la fixation du NAD. Cela n'est pas en contradiction avec la structure cristallographique obtenue à haute résolution de la GAPDH sauvage de *B. stearothermophilus*, qui peut être décrite comme un « dimère de dimères », en l'occurrence les dimères O-P et Q-R où les sous-unités sont symétriques par rapport à l'axe *P*.

Les GAPDH mutées (D186G-E276G) et (Y46G-S48G) produites sous forme strictement dimérique fixent le NAD avec une coopérativité positive, ce qui indique que le dimère O-P est probablement le dimère qui est responsable de la coopérativité de fixation du NAD à l'intérieur des GAPDH tétramériques. L'interface P est donc essentielle pour transmettre l'information structurale, induite par la fixation du NAD, d'une sous-unité à une autre alors que la boucle S de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *R* n'est pas directement impliquée dans la coopérativité de fixation

du NAD. Cette dernière conclusion confirme de précédentes observations, qui indiquaient qu'à l'intérieur de la GAPDH tétramérique de type sauvage, la conformation privilégiée de la boucle S dans la forme apoenzyme était identique à celle de la forme holoenzyme (Duée *et al*, 1996). L'ensemble de ces conclusions sont aussi en accord avec les observations réalisées après la superposition des structures cristallographiques obtenues à haute résolution des formes apo et holoenzyme de la GAPDH de *B. stearothermophilus* en utilisant comme cœur fixe du tétramère des résidus dont la position de la chaîne principale reste inchangée dans les deux formes. Une des conséquences de la transition apo-holo précédemment décrite (Skarzynski et Wonacott, 1988) est une rotation des dimères O-P et Q-R, l'un par rapport à l'autre d'environ deux degrés, qui peut être décomposée en deux rotations : Le dimère O-P tourne autour de l'axe *P* d'environ +1° et le dimère Q-R tourne dans la direction opposée d'environ –1° (Duée *et al*, 1996). Dans ce mouvement, les brins centraux (β_1, β_3, β_4 et β_8) des domaines catalytiques de chaque sous-unité, qui forment l'interface P, restent fixes et la rotation se fait par une variation des angles dièdres des résidus situés aux deux extrémités de ces brins. Nos résultats confirment donc l'hypothèse précédente dans laquelle les changements conformationnels induits par la fixation du NAD seraient transmis des brins externes du feuillet β de la sous-unité ayant fixé le NAD aux brins externes du feuillet β de la sous-unité symétrique par rapport à l'axe *P*.

Cependant, la nature des mutations peut moduler la coopérativité de fixation du NAD des GAPDH dimériques. En effet, contrairement aux GAPDH produites sous forme strictement dimérique et décrites ci-dessus, la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G), produite sous deux formes dimère et tétramère en équilibre, possède une coopérativité négative pour la fixation du NAD. Les différentes propriétés de coopérativité de fixation du NAD rencontrées chez la GAPDH de type sauvage et les GAPDH mutées doivent être la conséquence de différences structurales, dont l'identification éventuelle nécessiterait de disposer des structures cristallographiques à haute résolution des formes apo et holoenzyme de chaque GAPDH mutée.

La comparaison des rapports des constantes de dissociation microscopiques k_2/k_1 et des coefficients de Hill (n_H) des GAPDH ne possédant qu'un seul résidu muté montre que les résidus Ser48, Asn180 et Asp186 sont plus importants pour révéler la coopérativité négative que les résidus Tyr46 et Glu276. Dans la GAPDH de type sauvage, les résidus Ser48 et Tyr46 interagissent respectivement avec les résidus Asp186 et Glu276 via des liaisons hydrogènes à travers les interfaces R et Q, et le résidu Asn180 forme une liaison hydrogène avec l'oxygène du pyrophosphate du NAD. Sur la base de cette observation, nous pouvons conclure que l'interface P détermine la coopérativité de fixation du cofacteur des dimères O-P ou Q-R. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que les interactions avec le dimère voisin puissent aussi contribuer à stabiliser

les sous-unités du premier dimère dans une conformation optimale et donc participer à la coopérativité de fixation du cofacteur.

Il est aussi à noter que la GAPDH tétramérique de type sauvage fixe le NADP avec une coopérativité négative peu significative. La GAPDH mutée (D186G-E276G) produite sous forme strictement dimérique, quant à elle, fixe le NADP avec une coopérativité négative marquée alors qu'elle fixe le NAD avec une coopérativité positive marquée. Les changements conformationnels induits par la fixation des différents cofacteurs doivent différer mais il reste à déterminer au niveau structural les raisons permettant d'expliquer ces différents comportements.

Le suivi de l'extinction de fluorescence de la GAPDH de *B. stearothermophilus* lors de la fixation du cofacteur est une méthode indirecte pour caractériser les propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur. Dans le but de confirmer les résultats obtenus par une méthode directe, nous avons récemment entrepris l'étude de la fixation du NAD par la GAPDH de *B. stearothermophilus* par spectrométrie de masse électrospray en conditions natives, en collaboration avec le Dr A. Van Dorsselaer (CNRS-UMR 7509, Strasbourg). Le principe est fondé sur l'hypothèse qu'il doit être possible de séparer en fonction de leur masse moléculaire et donc de caractériser des populations de GAPDH possédant 0, 1, 2, 3, et 4 NAD fixés de façon non covalente. Pour ce faire, dans un premier temps, des conditions expérimentales ont été mises au point pour caractériser la GAPDH de *B. stearothermophilus* sous forme holoenzyme, sans que le NAD ne soit dissocié. Dans un second temps, des quantités croissantes de NAD ont été ajoutées à la forme apo en vue de définir les proportions respectives des formes apo, apo avec 1, 2, 3 et 4 molécules de NAD fixé, et ceci en se basant sur la hauteur relative des pics correspondant aux différentes formes. Les résultats récemment obtenus sont en cours d'interprétation. Le fait de disposer de différentes GAPDH mutées tétramériques, qui présentent une absence de coopérativité, une coopérativité positive et négative pour la fixation du NAD, ainsi que de GAPDH dimériques, qui présentent une coopérativité positive et négative pour la fixation du NAD, sera très utile pour valider cette nouvelle approche qui présente l'avantage d'être une méthode directe.

Seule la fixation du NAD par la forme tétramérique de type sauvage et par les deux formes dimère et tétramère de la GAPDH mutée (N180G-E276G) a été étudiée à la fois par suivi de l'extinction de fluorescence et par calorimétrie différentielle. La fixation du NAD par les GAPDH tétramériques de type sauvage et mutée (N180G-E276G) induit une transition structurale apo-holo (comme décrit dans la partie Introduction page 28), à l'origine de la coopérativité de fixation du cofacteur, qui s'accompagne d'une augmentation de la stabilité de la GAPDH vis-à-vis de la dénaturation thermique (t_{max}). Dans ces deux cas, l'augmentation de la valeur du t_{max} s'accompagne d'une diminution de la largeur à mi-hauteur des pics de capacité calorifique partielle suggérant que

la dénaturation des domaines catalytique et de fixation du cofacteur devient plus coopérative, c'est-à-dire que les interactions inter-domaines sont renforcées. La fixation du NAD par la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) produite sous deux formes dimère et tétramère en équilibre, qui présente des propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur, s'accompagne d'une plus faible augmentation de la stabilité de la GAPDH vis-à-vis de la dénaturation thermique, de l'ordre de 1°C. Cette augmentation semble néanmoins significative car elle s'accompagne d'une diminution non négligeable de la largeur à mi-hauteur du pic de capacité calorifique partielle. Cela pourrait signifier qu'à concentration saturante en NAD, les interactions entre le domaine catalytique et le domaine de fixation du cofacteur de la forme dimérique de la GAPDH mutée (N180G-E276G) sont également renforcées. La forme dimérique de cette GAPDH mutée présente des propriétés de coopérativité bien que la fixation du cofacteur ne soit pas optimale (comme indiqué par l'intensité de la bande d'absorption du complexe binaire GAPDH-NAD) et que celle-ci n'induise qu'une faible augmentation de la stabilité thermique, suggérant que la transition structurale apo-holo est incomplète. Nos résultats sont analogues à ceux obtenus pour le mutant N313T de la GAPDH d'*E. coli* qui présente des propriétés de coopérativité bien que des études cristallographiques ont démontré que la transition structurale apo-holo était incomplète (Corbier *et al*, 1990b ; Duée *et al*, 1996). Il serait intéressant de voir si on peut généraliser cette conclusion à la GAPDH mutée (Y46G-R52G) produite sous forme strictement dimérique et aux formes dimériques des GAPDH mutées D282G et (W84F-Y283V) produites sous deux formes dimère et tétramère en équilibre.

V) Etude de l'équilibre existant entre les deux formes oligomériques, dimère et tétramère du mutant (N180G-E276G) de la GAPDH de *B. stearothermophilus*.

Plusieurs schémas théoriques minimums peuvent être envisagés pour décrire l'équilibre s'établissant entre la forme dimérique inactive et la forme tétramérique active de la GAPDH mutée (N180G-E276G), à savoir :

Schéma ① : $T_{actif} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} 2\ D_{inactif}$ $\qquad K_{diss} = k_1/k_2$

Schéma ② : $T_{actif} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} T_{inactif} \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} 2\ D_{inactif}$ $\qquad K_{diss} = (k_1.k_3)/(k_2.k_4)$

Schéma ③ : $T_{actif} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} 2\ D_{actif} \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} 2\ D_{inactif}$ $\qquad K_{diss} = (k_1.k_3)/(k_2.k_4)$

où D, T, (k_1, k_2, k_3 et k_4) et K_{diss} représentent respectivement les formes dimérique et tétramérique, les constantes de vitesse de premier ou de second ordre et la constante d'équilibre de dissociation.

Les schémas ② et ③ sont sans doute simplifiés. Il se peut qu'il n'y ait pas une seule mais plusieurs formes d'intermédiaires tétramériques inactifs dans le schéma ②, ou dimériques actifs dans le schéma ③.

Le suivi de la cinétique de dissociation de la forme tétramérique active par la mesure de l'activité spécifique a permis de déterminer une constante de vitesse k_{obs} en vitesse initiale. Cette constante de vitesse k_{obs} étant indépendante de la concentration initiale en tétramère, ceci suggère que la perte d'activité est une réaction de premier ordre. Les trois schémas présentés satisfont à ce résultat. Aucun d'entre eux ne peut donc être éliminé à ce stade. Dans les schémas ② et ③, la constante de vitesse k_4 peut raisonnablement être négligée en vitesse initiale. Deux cas sont alors envisageables :

- soit la forme intermédiaire située entre la forme tétramérique active et la forme dimérique inactive s'accumule, c'est-à-dire qu'un pré-équilibre gouverne la concentration de la forme intermédiaire. Dans ce cas, k_2 est largement supérieure à k_3 et k_3 devient alors l'étape limitante.
- soit la forme intermédiaire située entre la forme tétramérique active et la forme dimérique inactive ne s'accumule pas, c'est-à-dire que dès que la forme intermédiaire apparaît, elle est transformée en dimère inactif. Dans ce cas, k_3 est largement supérieure à k_2 et k_1 devient alors l'étape limitante.

Le suivi de la cinétique d'association de la forme dimérique inactive par mesure de l'activité spécifique a permis de déterminer une constante de vitesse k_{obs} en vitesse initiale. Cette constante de vitesse k_{obs} est indépendante de la concentration initiale en dimère, suggérant que la cinétique d'apparition de l'activité est une réaction de premier ordre. Ce résultat permet d'exclure le schéma ①, où la cinétique d'apparition de l'activité se fait via un processus de second ordre, mais ne permet pas de différencier les schémas ② et ③. Dans le cas des schémas ② et ③, la constante de vitesse k_1 peut raisonnablement être négligée en vitesse initiale. Deux cas sont alors à nouveau envisageables :

- soit la forme intermédiaire située entre la forme tétramérique active et la forme dimérique inactive s'accumule et dans ce cas, k_3 est largement supérieure à k_2, k_2 devenant l'étape limitante.
- soit la forme intermédiaire située entre la forme tétramérique active et la forme dimérique inactive ne s'accumule pas et dans ce cas, k_2 est largement supérieure à k_3, k_4 devenant l'étape limitante.

Au cours de la réaction d'association de la forme dimérique inactive en forme tétramérique active, la quantité totale de forme tétramérique active, qui est formée quand l'équilibre est atteint, ne représente que 10% de la quantité de forme tétramérique active théoriquement attendue, d'après le calcul réalisé à partir de la constante d'équilibre de dissociation K_{diss}. Pour ce calcul, nous avons supposé que l'activité spécifique de la forme tétramérique active néoformée est identique à celle de la forme tétramérique initiale. Le fait que l'activité spécifique mesurée sur des fractions aliquotes du pic d'élution correspondant à la forme tétramérique est identique à celle de la forme tétramérique initiale confirme l'hypothèse émise. L'addition de NAD n'a aucune influence.

Il reste donc à expliquer l'apparente absence de réversibilité totale de l'équilibre. A partir de nos résultats, qui indiquent que seule une très faible quantité de protéine peut s'agréger, nous pouvons exclure l'hypothèse que l'apparente non réversibilité est due à une précipitation d'une partie de la protéine. Il faut d'ailleurs souligner qu'un tel processus irréversible devrait être observé également dans le sens dissociation et donc diminuer ainsi la quantité de tétramère actif présent à l'équilibre. De plus, lorsque l'équilibre est atteint et que le dimère isolé est de nouveau incubé jusqu'à atteindre l'équilibre, il conduit au même pourcentage de tétramère actif, à savoir 10% par rapport à la valeur attendue. Ceci suggère donc que nous sommes bien en présence d'un processus réversible.

Les raisons de l'apparente absence de réversibilité totale que nous observons restent à élucider. Un certain nombre d'études complémentaires pourraient alors être entreprises. Par exemple, nous avons interprété la constante d'équilibre de dissociation K_{diss} sur l'hypothèse que toute forme de la GAPDH qui ne présentait pas d'activité enzymatique se trouvait sous forme dimérique. N'aurions nous pas, en fait, deux formes tétramériques qui coexisteraient, l'une inactive et l'autre active, ce qui supposerait que la forme tétramérique inactive se dissocierait sur le support de la filtration sur gel utilisée ? Nous pourrions envisager des expériences qui nous permettraient de mettre en évidence cette forme tétramérique inactive et de calculer la quantité respective de chaque forme tétramérique active et inactive. Par exemple, une expérience d'ultracentrifugation analytique réalisée dans les conditions de mesure d'une vitesse de sédimentation, c'est-à-dire à vitesse élevée et pendant des temps courts comparé au temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, avec un échantillon composé de forme dimérique inactive qui a été incubé de façon à atteindre l'équilibre, pourrait remplir ces conditions. La comparaison de la quantité de forme tétramérique estimée à partir des mesures d'activité spécifique et de celle estimée à partir des expériences d'ultracentrifugation analytique nous indiquerait si une forme tétramérique inactive est présente à l'équilibre, si on considère que cette forme tétramérique ne se dissocie pas dans les conditions de l'expérience. Des expériences de spectrométrie de masse électrospray en conditions natives pourraient aussi remplir ces conditions. En effet, il est possible que la forme tétramérique inactive,

du fait d'une conformation différente, puisse présenter une charge nette différente de celle des formes dimérique initiale ($D_{inactif}$) et tétramérique finale (T_{actif}), permettant ainsi de séparer deux formes de masse moléculaire identique.

Les résultats obtenus sur le double mutant (N180G-E276G) sont-ils généralisables à d'autres mutants ? Dans le cas du mutant Y283V, une valeur de constante d'équilibre de dissociation supérieure d'un facteur 10 à celle du mutant (N180G-E276G) a été obtenue, suggérant que la stabilisation des interfaces de cette GAPDH tétramérique est plus faible. Les résultats des études réalisées dans le sens association sont similaires à ceux du double mutant, à savoir un faible pourcentage de la forme tétramérique active formée, comparativement à la valeur théorique calculée. Il semble donc que cette apparente non réversibilité soit une propriété généralisable à l'ensemble des mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* en équilibre dimère-tétramère. Dans ce contexte, il serait intéressant de tester l'influence de la température, du pH et de la force ionique sur ce phénomène d'apparente non réversibilité. De façon plus globale, il serait nécessaire d'étendre l'étude des mutants de la GAPDH de *B. stearothermophilus* en équilibre dimère-tétramère à celle d'autres mutants générés à partir d'autres GAPDH, par exemple, la GAPDH d'*E. coli* dont nous connaissons toutes les caractéristiques structurales (Duée *et al*, 1996).

D'autres approches pourraient être aussi utilisées pour établir et étudier l'équilibre dimère et tétramère, en ajoutant par exemple un analogue de cofacteur comme l'ATP ou en faisant varier la pression, comme cela a été décrit pour la GAPDH de *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que les conditions expérimentales utilisées ne peuvent montrer si les formes dimériques sont actives, elles présentent cependant l'avantage de travailler sur une enzyme non mutée. Adapter ces conditions expérimentales à la GAPDH de *B. stearothermophilus* sauvage et à la forme tétramérique d'un mutant comme (N180G-E276G) en équilibre dimère-tétramère, permettrait de mieux préciser le rôle des mutations introduites aux interfaces R et Q.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

BIBLIOGRAPHIE

Adair, G. S. (1925). The oxygen dissociation curve of hemoglobin. J. Biol. Chem., **63**, 529-545.

Allen, G., et Harris, J. I. (1975). The binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochem. J., **151**, 747-749.

Argos, P. (1988). An investigation of protein subunit and domain interfaces. Protein Eng., **2**, 101-113.

Armstrong, J. M. D., et Trentham, D. R. (1976). The reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate with thiols and the holoenzyme D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and of inorganic phosphate with the acyl-holoenzyme. Biochem. J., **159**, 513-527.

Asakura, S. (1968). A kinetic study of in vitro polymerization of flagellin. J. Mol. Biol., **35**, 237-239.

Baldwin, R. L., et Rose, G. D. (1999a). Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. Trends Biochem. Sci., **24**, 26-33.

Baldwin, R. L., et Rose, G. D. (1999b). Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. Trends Biochem. Sci., **24**, 77-83.

Barlow, D. J., et Thornton, J. M. (1983). Ion-pairs in proteins. J. Mol. Biol., **168**, 867-885.

Beernink, P. T., et Tolan, D. R. (1994). Subunit interface mutants of rabbit muscle aldolase form active dimers. Protein Sci., **3**, 1383-1391.

Beernink, P. T., et Tolan, D. R. (1996). Disruption of the aldolase A tetramer into catalytically active monomers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 5374-5379.

Bennett, M. J., Choe, S., et Eisenberg, D. (1994). Domain swapping: entangling alliances between proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 3127-3131.

Bennett, M. J., Schlunegger, M. P., et Eisenberg, D. (1995). 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. Protein Sci., **4**, 2455-2468.

Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., et Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. Eur. J. Biochem., **80**, 319-324.

Beth, A. H., Robinson, B. H., Cobb, C. E., Dalton, L. R., Trommer, W. E., Birktoft, J. J., et Park, J. H. (1984). Interactions and spatial arrangement of spin-labeled NAD+ bound to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Comparison of EPR and X-ray modeling data. J. Biol. Chem., **259**, 9717-9728.

Biesecker, G., Harris, J. I., Thierry, J. C., Walker, J. E., et Wonacott, A. J. (1977). Sequence and structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Nature, **266**, 328-333.

Bloch, W., MacQuarrie, R. A., et Bernhard, S. A. (1971). The nucleotide and acyl group content of native rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., **246**, 780-790.

Bloom, C. R., Kaarsholm, N. C., Ha, J., et Dunn, M. F. (1997). Half-site reactivity, negative cooperativity, and positive cooperativity: quantitative considerations of a plausible model. Biochemistry, **36**, 12759-12765.

Boers, W., Oosthuizen, C., et Slatter, E. C. (1971). Binding of NAD+ and NADH to rabblit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta, **250**, 35-46.

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., et Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new vehicles - II. A multiple purpose cloning system. Gene, **2**, 95-113.

Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R., et Wierenga, R. K. (1994). Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 1515-1518.

Borchert, T. V., Kishan, K. V., Zeelen, J. P., Schliebs, W., Thanki, N., Abagyan, R., Jaenicke, R., et Wierenga, R. K. (1995). Three new crystal structures of point mutation variants of monoTIM: conformational flexibility of loop-1, loop-4 and loop-8. Structure, **3**, 669-679.

Bosca, L., Aragon, J. J., et Sols, A. (1985). Modulation of muscle phosphofructokinase at physiological concentration of enzyme. J. Biol. Chem., **260**, 2100-2107.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**, 248-254.

Branlant, G., Eiler, B., Biellmann, J. F., Lutz, H. P., et Luisi, P. L. (1983a). Applicability of the induced-fit model to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from sturgeon muscle. Study of the binding of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide 8-bromoadenine dinucleotide. Biochemistry, **22**, 4437-4443.

Branlant, G., Flesh, G., et Branlant, C. (1983b). Molecular cloning of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes of *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli* and their expression in *Escherichia coli*. Gene, **25**, 1-7.

Branlant, G., et Branlant, C. (1985). Nucleotide sequence of the *E. coli* gap gene. Different evolutionary behaviour of the NAD^+ binding domain and the catalytic domain of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., **150**, 61-66.

Branlant, C., Oster, T., et Branlant, G. (1989). Nucleotide sequence determination of the DNA region coding for *Bacillus stearothermophilus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and of the flanking DNA regions required for its expression in *Escherichia coli*. Gene, **75**, 145-155.

Breiter, D. R., Resnik, E., et Banaszak, L. J. (1994). Engineering the quaternary structure of an enzyme: construction and analysis of a monomeric form of malate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Protein Sci., **3**, 2023-2032.

Buehner, M., Ford, G. C., Moras, D., Olsen, K. W., et Rossmann, M. G. (1974). Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., **90**, 25-49.

Cameron, A. D., Roper, D. I., Moreton, K. M., Muirhead, H., Holbrook, J. J., et Wigley, D. B. (1994). Allosteric activation in *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase investigated by an X-ray crystallographic analysis of a mutant designed to prevent tetramerization of the enzyme.J. Mol. Biol., **238**, 615-625.

Canellas, P. F., et Cleland, W. W. (1991). Carbon-13 and deuterium isotope effects on the reaction catalyzed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, **30**, 8871-8876.

Carter, P., Bedouelle, H., et Winter, G. (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. Nucleic Acids Res., **13**, 4431-4443.

CCP4. (1994). *The SERC (UK) Collaborative Computing Project No 4, a suite of Programs for Protein Crystallography*, distribué par Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, UK.

Chakrabartty, A., Schellman, J.A. and Baldwin, R.L. (1991) Large differencies in the helix propensities of alanine and glycine. Nature, **351**, 586-588.

Chothia, C., et Janin, J. (1975). Principles of protein-protein recognition. Nature, **256**, 705-708.

Chothia, C., et Janin, J. (1981). Relative orientation of the close-packed β-pleated sheets in Proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 4146-4150.

Chothia, C., Levitt, M., et Richardson, D. (1981). Helix to helix packing in proteins. J. Mol. Biol., **145**, 215-250.

Cioni, P., et Strambini, G. B. (1994). Pressure effects on protein flexibility monomeric proteins. J. Mol. Biol., **242**, 291-301.

Clermont, S., Corbier, C., Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A., et Branlant, G. (1993). Determinants of coenzyme specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of the acidic residue in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. Biochemistry, **32**, 10178-10184.

Colombo, M. F., Rau, D. C., et Parsegian, V. A. (1992). Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. Science, **256**, 655-659.

Constantinides, S. M., et Deal, W. C., Jr. (1969). Reversible dissociation of tetrameric rabbit muscle glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase into dimers or monomers by adenosine triphosphate. J. Biol. Chem., **244**, 5695-5702.

Constantinides, S. M., et Deal, W. C., Jr. (1970). Reversible dissociation of tetrameric 7.4 S rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase into 4.4 S dimers by' ammonium sulfate and into 3.2 S monomers by KC1. J. Biol. Chem., **245**, 246-253.

Conway, A., et Koshland, D. E., Jr. (1968). Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, **7**, 4011-4023.

Cook, R. A., et Koshland, D. E., Jr. (1969). Specificity in the assembly of multisubunit proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **64**, 247-254.

Cook, R. A., et Koshland, D. E., Jr. (1970). Positive and negative cooperativity in yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, **9**, 3337-3342.

Corbier, C., Clermont, S., Billard, P., Skarzynski, T., Branlant, C., Wonacott, A., et Branlant, G. (1990a). Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis. Biochemistry, **29**, 7101-7106.

Corbier, C., Mougin, A., Mely, Y., Adolph, H. W., Zeppezauer, M., Gerard, D., Wonacott, A., et Branlant, G. (1990b). The nicotinamide subsite of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by site-directed mutagenesis. Biochimie, **72**, 545-554.

Corbier, C., Della Seta, F., et Branlant, G. (1992). A new chemical mechanism catalyzed by a mutated aldehyde dehydrogenase. Biochemistry, **31**, 12532-12535.

Corbier, C., Michels, S., Wonacott, A. J., et 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.

De Vijlder, J. J. M., et Slater, E. C. (1968). The reaction between NAD^+ and rabbit-muscle glyceraldehydephosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta, **167**, 23-34.

De Vijlder, J. J. M., Boers, W., et Slater, E. C. (1969). Binding and properties of NAD^+ in glyceraldehydephosphate dehydrogenase from lobster-tail muscle. Biochim. Biophys. Acta, **191**, 214-220.

Delhaise, P., Bardiaux, M., et Wodak, S. J. (1984). J. Mol. Graphics, **2**, 103-106.

Deng, W. P., et Nickoloff, J. A. (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. Analytical Biochemistry, **200**, 81-88.

Didierjean, C., Rahuel-Clermont, S., Vitoux, B., Dideberg, O., Branlant, G., et Aubry, A. (1997). A crystallographic comparison between mutated glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* complexed with either NAD+ or NADP+. J. Mol. Biol., **268**, 739-759.

Duée, E., Olivier-Deyris, L., Fanchon, E., Corbier, C., Branlant, G., et 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., et Dennis, D. T. (1974a). Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Assay and steady state kinetics. J. Biol. Chem., **249**, 167-174.

Duggleby, R. G., et Dennis, D. T. (1974b). 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**, 175-181.

Ehrig, T., Muhoberac, B. B., Brems, D., et Bosron, W. F. (1993). Monomers of human beta 1 beta 1 alcohol dehydrogenase exhibit activity that differs from the dimer. J. Biol. Chem., **268**, 11721-11726.

Eisenstein, E., et Schachman, H. K. (1989) dans *Protein function* , 135-176, IRL, Oxford.

Ellis, K. J., Kuntz, K., et Sturtevant, J. M. (1971). The activation of muscle adenylate deaminase by substrate. J. Biol. Chem., **246**, 6631-6637.

Fahien, L. A. (1967). A study of the reaction of glyceraldehyde with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., **241**, 4115-4123.

Fenton, W. A., et Horwich, A. L. (1997). GroEL-mediated protein folding. Protein Sci., **6**, 743-760.

Ferdinand, W. (1964). The isolation and specific activity of rabbit muscle D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., **92**, 578-585.

Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman & Co, New York.

Frauenfelder, H., Sligar, S. G., et Wolynes, P. G. (1991). The energy landscapes and motions of proteins. Science, **254**, 1598-1603.

Freedman, R. B. (1992) dans *Protein Folding* (Creighton, T. E., Ed.) , 455-539, Freeman, New York.

Frydman, J., et Höhfeld, J. (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. Trends Biochem. Sci., **22**, 87-92.

Fuchs, A., Seiderer, C., et Seckler, R. (1991). In vitro folding pathway of phage P22 tailspike protein. Biochemistry, **30**, 6598-6604.

Furfine, C. S., et Velick, S. F. (1965). The acyl-enzyme intermediate and the kinetic mechanism of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. J. Biol. Chem. **240**, 845-855.

Gabellieri, E., Rahuel-Clermont, S., Branlant, G., et Strambini, G. B. (1996). Effects of NAD+ binding on the luminescence of tryptophans 84 and 310 of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochemistry, **35**, 12549-12559.

Gilboa, R., Bauer, A. J., et Shoham, G. (1998). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast). Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, **54**, 1467-1470.

Giorgio, N. A., Jr., Yip, A. T., Fleming, J., et Plaut, G. W. (1970). Diphosphopyridine nucleotide-linked isocitrate dehydrogenase from bovine heart. Polymeric forms and subunits. J. Biol. Chem., **245**, 5469-5477.

Girg, R., Rudolph, R., et Jaenicke, R. (1981). Limited proteolysis of porcine-muscle lactic dehydrogenase by thermolysin during reconstitution yields dimers. Eur. J. Biochem., **119**, 301-305.

Gittelman, M. S., et Matthews, C. R. (1990). Folding and stability of trp aporepressor from *Escherichia coli*. Biochemistry, **29**, 7011-7020.

Glöggler, K. G., Balasubramanian, K., Beth, A. H., Park, J. H., et Trommer, W. E. (1982). The role of the nicotinamide moiety of NAD+ for negative cooperativity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as studied by spin-labeled cofactors. Biochim. Biophys. Acta, **706**, 197-202.

Gokhale, R. S., Agarwalla, S., Francis, V. S., Santi, D. V., et Balaram, P. (1994). Thermal stabilization of thymidylate synthase by engineering two disulfide bridges across the dimer interface. J. Mol. Biol., **235**, 89-94.

Goldberg, M. E. (1985). The second translation of the genetic message : protein folding and assembly. Trends Biochem. Sci., **10**, 388-391.

Goodsell, D. S. (1991). Inside a living cell. Trends Biochem. Sci., **16**, 203-206.

Goodsell, D. S., et Olson, A. J. (1993). Soluble proteins: size, shape and function. Trends Biochem. Sci., **18**, 65-68.

Gross, M., et Jaenicke, R. (1994). Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. Eur. J. Biochem., **221**, 617-630.

Haase-Pettingell, C. A., et King, J. (1988). Formation of aggregates from a thermolabile in vivo folding intermediate in P22 tailspike maturation. A model for inclusion body formation. J. Biol. Chem., **263**, 4977-4983.

Harrigan, P. J., et 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**, 695-703.

Harrigan, P. J., et Trentham, D. R. (1974). Kinetic studies of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide facilitated reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., **143**, 353-363.

Harris, J. I., et Waters, M. (1976) dans *The Enzymes* (Boyer, P. D., Ed.) , 1-49, Academic Press, New York.

Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature, **381**, 571-579.

Hélène, C., Brun, F., et Yaniv, M. (1971). Fluorescence studies of interactions between *Escherichia coli* valyl-tRNA synthetase and its substrates. J. Mol. Biol., **58**, 349-365.

Henis, Y. I., et Levitzki, A. (1977). The role of the nicotinamide and adenine subsites in the negative co- operativity of coenzyme binding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., **117**, 699-716.

Henis, Y. I., et Levitzki, A. (1980). Mechanism of negative cooperativity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deduced from ligand competition experiments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 5055-5059.

Honzatko, R. B., Hendrickson, W. A., et Love, W. E. (1985). Refinement of a molecular model for lamprey hemoglobin from *Petromyzon marinus*. J. Mol. Biol., **184**, 147-164.

Huang, T. M., et Chang, G. G. (1992). Characterization of the tetramer-dimer-monomer equilibrium of the enzymatically active subunits of pigeon liver malic enzyme. Biochemistry, **31**, 12658-12664.

Hubbard, S. J., et Argos, P. (1994). Cavities and packing at protein interfaces. Protein Sci., **3**, 2194-2206.

Hubbard, S. J., Gross, K. H., et Argos, P. (1994). Intramolecular cavities in globular proteins. Protein Eng., **7**, 613-626.

Iglesias, A. A., et Andreo, C. S. (1990). NADP-dependent malate dehydrogenase (decarboxylating) from sugar cane leaves. Kinetic properties of different oligomeric structures. Eur. J. Biochem., **192**, 729-733.

Inoue, H., Nojima, H., et Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, **96**, 23-28.

Ishima, R., Akasaka, K., Aizawa, S., et Vonderviszt, F. (1991). Mobility of the terminal regions of flagellin in solution. J. Biol. Chem., **266**, 23682-23688.

Jackson, R. M., Gelpi, J. L., Cortes, A., Emery, D. C., Wilks, H. M., Moreton, K. M., Halsall, D. J., Sleigh, R. N., Behan-Martin, M., Jones, G. R., *et al.* (1992). Construction of a stable dimer of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. Biochemistry, **31**, 8307-8314.

Jaenicke, R., et Rudolph, R. (1980) dans *Protein folding* , 525-548, Elsevier, North-Holland, Amsterdam.

Jaenicke, R., Vogel, W., et Rudolph, R. (1981). Dimeric intermediates in the dissociation of lactic dehydrogenase. Eur. J. Biochem., **114**, 525-531.

Jaenicke, R., et Rudolph, R. (1986). Refolding and association of oligomeric proteins. Methods Enzymol., **131**, 218-250.

Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. Prog. Biophys. Mol. Biol., **49**, 117-237.

Jaenicke, R., et Rudolph, R. (1989) dans *Protein Structure : A Practical Approach* , 191-223, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.

Jaenicke, R. (1991). Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. Biochemistry, **30**, 3147-3161.

Jaenicke, R. (1995). Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci., **348**, 97-105.

Jaenicke, R. (1996). How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability? Naturwissenschaften, **83**, 544-554.

Jaenicke, R. (1998). Protein self-organization in vitro and in vivo: partitioning between physical biochemistry and cell biology. Biol. Chem., **379**, 237-243.

Janin, J., Miller, S., et Chothia, C. (1988). Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. J. Mol. Biol., **204**, 155-164.

Janin, J., et Chothia, C. (1990). The structure of protein-protein recognition sites. J. Biol. Chem., **265**, 16027-16030.

Janin, J. (1991). Protein-Protein interactions and assembly. Curr. Opin. Struct. Biol., **1**, 42-44.

Jecht, M., Tomschy, A., Kirschner, K., et Jaenicke, R. (1994). Autonomous folding of the excised coenzyme-binding domain of D- glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. Protein Sci., **3**, 411-418.

Jones, S., et Thornton, J. M. (1995). Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. Prog. Biophys. Mol. Biol., **63**, 31-65.

Jones, S., et Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 13-20.

Jones, S., et Thornton, J. M. (1997). Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. J. Mol. Biol., **272**, 121-132.

Kalman, M., Nuridsany, M., et Ovadi, J. (1980). Substrate-induced dissociation of glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase detected by affinity chromatography. Study of subunit interactions by affinity sorption. Biochim. Biophys. Acta, **614**, 285-293.

Kelemen, N., Kellershohn, N., et Seydoux, F. (1975). Sturgeon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., **57**, 69-78.

Keleti, T. (1964). Studies on D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta, **89**, 422-430.

Kim, H., et Hol, W. G. (1998). Crystal structure of *Leishmania mexicana* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a new crystal form confirms the putative physiological active site structure. J. Mol. Biol., **278**, 5-11.

Kim, P. S., et Baldwin, R. L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. Annu. Rev. Biochem., **59**, 631-660.

Kirschner, K., Gallego, E., Schuster, I., et Goodall, D. (1971). Co-operative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. I. Equilibrium and temperature-jump studies at pH 8-5 and 40 degrees C. J. Mol. Biol., **58**, 29-50.

Kirschner, K. (1971). Co-operative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. II. Stopped-flow studies at pH 8-5 and 40 degrees C. J. Mol. Biol., **58**, 51-68.

Klepp, J., Oberfrank, M., Retey, J., Tritsch, D., Biellmann, J.-F., et Hull, W. E. (1989). Nature of coenzyme binding by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - ^{13}C studies with oxidized [4-^{13}C] nicotinamide adenine dinucleotide. J. Am. Chem. Soc., **111**, 4440-4447.

Klotz, I. M., Darnall, D. W., et Langerman, N. R. (1975) dans *The Proteins* , 293-411, Academic Press, New York.

Kohlhoff, M., Dahm, A., et Hensel, R. (1996). Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. FEBS Lett., **383**, 245-250.

Korn, A. P., et Burnett, R. M. (1991). Distribution and complementarity of hydropathy in multisubunit proteins. Proteins, **9**, 37-55.

Korndörfer, I., Steipe, B., Huber, R., Tomschy, A., et 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**, 511-521.

Koshland, D. E., Jr., Nemethy, G., et Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry, **5**, 365-385.

Kosk-Kosicka, D., et Bzdega, T. (1988). Activation of the erythrocyte Ca2+-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. J. Biol. Chem., **263**, 18184-18189.

Kosower, E. M. (1956). Additions to pyridinium rings - III Chemical and biochemical implications of charge-transfer complex intermediates. J. Am. Chem. Soc., **78**, 3497-3501.

Kraulis, P. J. (1991). Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J. Applied Cristal., **24**, 946-950.

Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci., **82**, 488-492.

Kunkel, T. A., Bebenek, K., et McClary, J. (1991). Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. Methods Enzymol., **204**, 125-139.

Kurganov, B. I. (1982) *Allosteric Enzymes*, John Wiley et Sons ed., New York.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-687.

Lamzin, V. S., Aleshin, A. E., Strokopytov, B. V., Yukhnevich, M. G., Popov, V. O., Harutyunyan, E. H., et Wilson, K. S. (1992). Crystal structure of NAD-dependent formate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., **206**, 441-452.

Larsen, T. A., Olson, A. J., et Goodsell, D. S. (1998). Morphology of protein-protein interfaces. Structure, **6**, 421-427.

Lee, B., et Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of statistic accessibility. J. Mol. Biol., **55**, 379-400.

Leslie, A. G., et Wonacott, A. J. (1983). Coenzyme binding in crystals of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., **165**, 375-391.

Leslie, A. G. W., et Wonacott, A. J. (1984). Structural evidence for ligand-induced sequential conformational changes in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., **178**, 743-772.

Levashov, P., Orlov, V., Boschi-Muller, S., Talfournier, F., Asryants, R., Bulatnikov, I., Muronetz, V., Branlant, G., et Nagradova, N. (1999). Thermal unfolding of phosphorylating D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by differential scanning calorimetry. Biochim. Biophys. Acta, **1433**, 294-306.

Liang, J., Edelsbrunner, H., et Woodward, C. (1998). Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. Protein Sci., **7**, 1884-1897.

Liu, L., et Huskey, W. P. (1992). Progress in establishing the rate-limiting features and kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. Biochemistry, **31**, 6898-6903.

Liu, 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 Wang, B. C. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. Nat. Struct. Biol., **4**, 317-326.

Lusty, C. J. (1981). Catalytically active monomer and dimer forms of rat liver carbamoyl- phosphate synthetase. Biochemistry, **20**, 3665-3674.

Malhotra, O. P., et Bernhard, S. A. (1968). Spectrophotometric identification of an active site-specific acyl glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The regulation of its kinetic and equilibrium properties by coenzyme. J. Biol. Chem., **243**, 1243-1252.

Malhotra, O. P., et Bernhard, S. A. (1973). Activation of a covalent enzyme-substrate bond by noncovalent interaction with an effector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2077-2081.

Malhotra, O. P., Tikoo, K., Kayastha, A. M., Srinivasan, et Gupta, A. K. (1992). Effect of coenzymes on the quaternary structure conformation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of mung beans and rabbit muscle. Indian J. Biochem. Biophys., **29**, 469-476.

Maniatis, T., Fritch, E. F., et Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning*, Cold spring Harbor press, New York.

Manning, L. R., Jenkins, W. T., Hess, J. R., Vandegriff, K., Winslow, R. M., et Manning, J. M. (1996). Subunit dissociations in natural and recombinant hemoglobins. Protein Sci., **5**, 775-781.

Marchal, S., et Branlant, G. (1999). Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from Streptococcus mutans. Biochemistry, **38**, 12950-12958.

Masson, P. (1992) dans *High Pressure and Biotechnology*, Vol. 224, Colloque INSERM.

McDonald, I. K., et Thornton, J. M. (1994). Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. J. Mol. Biol., **238**, 777-793.

Mercer, W. D., Winn, S. I., et Watson, H. C. (1976). Twinning in crystals of human skeletal muscle D-glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., **104**, 277-283.

Meunier, J. C., et Dalziel, K. (1978). Kinetic studies of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. Eur. J. Biochem., **82**, 483-492.

Michels, S., Rogalska, E., et Branlant, G. (1996). Phosphate Binding Sites In Phosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase From *Bacillus stearothermophilus*. Eur. J. Biochem., **235**, 641-647.

Miller, S., Janin, J., Lesk, A. M., et Chothia, C. (1987a). Interior and surface of monomeric proteins. J. Mol. Biol., **196**, 641-656.

Miller, S., Lesk, A. M., Janin, J., et Chothia, C. (1987b). The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. Nature, **328**, 834-836.

Miller, S. (1989). The structure of interfaces between subunits of dimeric and tetrameric proteins. Protein Eng., **3**, 77-83.

Monod, J., Wyman, J., et Changeux, J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions : a plausible model. J. Mol. Biol., **12**, 88-118.

Moras, D., Olsen, K. W., Sabesan, M. N., Buehner, M., Ford, G. C., et 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.

Morize, I., Surcouf, E., Vaney, M. C., Epelboin, Y., Buehner, M., Fridlansky, F., Milgrom, E., et Mornon, J. P. (1987). Refinement of the C222(1) crystal form of oxidized uteroglobin at 1.34 A resolution. J. Mol. Biol., **194**, 725-739.

Mougin, A., Corbier, C., Soukri, A., Wonacott, A., Branlant, C., et Branlant, G. (1988). Use of site-directed mutagenesis to probe the role of Cys149 in the formation of charge transfer transition in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Prot. Eng., **2**, 859-872.

Murry-Brelier, A., et Goldberg, M. E. (1989). Alternate succession of steps can lead to the folding of a multidomain oligomeric protein. Proteins, **6**, 395-404.

Murthy, M. R. N., Garavito, R. M., Johnson, J. E., et Rossmann, M. J. (1980). Structure of lobster apo-D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 3.0 Å resolution. J. Mol. Biol., **138**, 859-872.

Neet, K. E., et Timm, D. E. (1994). Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. Protein Sci., **3**, 2167-2174.

Netzer, W. J., et Hartl, F. U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. Trends Biochem. Sci., **23**, 68-73.

Nguyen, T. T., Muench, K. A., et Bryant, F. R. (1993). Inactivation of the recA protein by mutation of histidine 97 or lysine 248 at the subunit interface. J. Biol. Chem., **268**, 3107-3113.

Nichols, R., Weaver, C. D., Eisenstein, E., Blakley, R. L., Appleman, J., Huang, T. H., Huang, F. Y., et Howell, E. E. (1993). Titration of histidine 62 in R67 dihydrofolate reductase is linked to a tetramer two-dimer equilibrium. Biochemistry, **32**, 1695-1706.

Noble, M. E., Zeelen, J. P., et Wierenga, R. K. (1993). Structures of the "open" and "closed" state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: implications for the reaction mechanism. Proteins, **16**, 311-326.

Opitz, U., Rudolph, R., Jaenicke, R., Ericsson, L., et Neurath, H. (1987). Proteolytic dimers of porcine muscle lactate dehydrogenase: characterization, folding, and reconstitution of the truncated and nicked polypeptide chain. Biochemistry, **26**, 1399-1406.

Orsi, B. A., et Cleland, W. W. (1972). Inhibition and kinetic mechanism of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, **11**, 102-109.

Peng, X., Jonas, J., et Silva, J. L. (1993). Molten-globule conformation of Arc repressor monomers determined by high-pressure 1H NMR spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 1776-1780.

Porvari, K. S., Herrala, A. M., Kurkela, R. M., Taavitsainen, P. A., Lindqvist, Y., Schneider, G., et Vihko, P. T. (1994). Site-directed mutagenesis of prostatic acid phosphatase. Catalytically important aspartic acid 258, substrate specificity, and oligomerization. J. Biol. Chem., **269**, 22642-22646.

Poulos, T. L., Finzel, B. C., et Howard, A. J. (1987). High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. J. Mol. Biol., **195**, 687-700.

Prestrelski, S. J., Arakawa, T., Duker, K., Kenney, W. C., et Narhi, L. O. (1994). The conformational stability of a non-covalent dimer of a platelet- derived growth factor-B mutant lacking the two cysteines involved in interchain disulfide bonds. Int. J. Pept. Protein Res., **44**, 357-363.

Racker, E., et Krimsky, I. (1952). The mechanism of oxidation of aldehydes by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., **198**, 731-743.

Rashin, A. A., Iofin, M., et Honig, B. (1986). Internal cavities and buried waters in globular proteins. Biochemistry, **25**, 3619-3625.

Richards, F. M. (1977). Areas, volumes, packing and protein structure. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **6**, 151-176.

Ridgway, J. B., Presta, L. G., et Carter, P. (1996). 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng., **9**, 617-621.

Roitel, O., Sergienko, E. and Branlant G. (1999). Dimers generated form tetrameric phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* are inactive but exhibit cooperativity in NAD binding. Biochemistry, **38**, 16084-16091.

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., et Webb, L. (1973). Letter: Molecular symmetry axes and subunit interfaces in certain dehydrogenases. J. Mol. Biol., **76**, 533-537.

Rossmann, M. G., Moras, D., et Olson, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide binding protein. Nature, **250**, 194-199.

Roussel, A., et Cambillau, C. (1989) dans *Silicon Graphics Geometry Partner Directory* (Silicon Graphics, e., Ed.) , 77-78, Silicon Graphics, Mountain View, CA.

Ruan, K., et Weber, G. (1989). Hysteresis and conformational drift of pressure-dissociated glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Biochemistry, **28**, 2144-2153.

Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., et Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. EMBO J., **16**, 1501-1507.

Schade, B. C., Rudolph, R., Ludemann, H. D., et Jaenicke, R. (1980). Reversible high-pressure dissociation of lactic dehydrogenase from pig muscle. Biochemistry, **19**, 1121-1126.

Schlessinger, J., et Levitzki, A. (1974). Molecular basis of negative co-operativity in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., **82**, 547-561.

Schlessinger, J., Steinberg, I. Z., et Levitzki, A. (1975). A comparative study of NAD+ binding sites in dehydrogenases by circular polarization of fluorescence. J. Mol. Biol., **91**, 523-528.

Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., et Wierenga, R. (1996). Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. Protein Sci., **5**, 229-239.

Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., et Wierenga, R. K. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. Biochemistry, **36**, 9655-9662.

Schlunegger, M. P., Bennett, M. J., et Eisenberg, D. (1997). Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. Adv. Protein Chem., **50**, 61-122.

Scholtz, J. M., Qian, H., York, E. J., Stewart, J. M., et Baldwin, R. L. (1991). Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lenghts in water. Biopolymers **31**, 1463-1470.

Schulz, G. E., et Schirmer, R. H. (1979) dans *Principles of Protein Structure* , 52-98, Springer-Verlag.

Schulz, G. E., Schirmer, R. H., et Pai, E. F. (1982). FAD-binding site of glutathione reductase. J. Mol. Biol., **160**, 287-308.

Seckler, R., Fuchs, A., King, J., et Jaenicke, R. (1989). Reconstitution of the thermostable trimeric phage P22 tailspike protein from denatured chains in vitro. J. Biol. Chem., **264**, 11750-11753.

Segal, H. L., et Boyer, P. D. (1953). The role of sulhydryl groups in the activity of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., **204**, 265-281.

Seydoux, F., Bernhard, S., Pfenninger, O., Payne, M., et Malhotra, O. P. (1973). Preparation and active-site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde-3-phoshate dehydrogenase. Biochemistry, **12**, 4290-4300.

Seydoux, F., Malhotra, O. P., et Bernhard, S. A. (1974). Half-site reactivity. CRC Crit. Rev. Biochem., **2**, 227-257.

Shoichet, B. K., et Kuntz, I. D. (1991). Protein docking and complementarity. J. Mol. Biol., **221**, 327-346.

Shoichet, B. K., et Kuntz, I. D. (1993). Matching chemistry and shape in molecular docking. Protein Eng., **6**, 723-732.

Silva, J. L., Foguel, D., Da Poian, A. T., et Prevelige, P. E. (1996). The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. Curr. Opin. Struct. Biol., **6**, 166-175.

Silva, J. L., et Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins. Annu. Rev. Phys. Chem., **44**, 89-113.

Skarzynski, T., Moody, P. C. E., et Wonacott, A. J. (1987). Structure of holo-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 resolution. J. Mol. Biol., **193**, 171-187.

Skarzynski, T., et Wonacott, A. J. (1988). Coenzyme-induced conformational changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. J. Mol. Biol., **203**, 1097-1118.

Song, S., Li, J., et Lin, Z. (1998). Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor* refined at 2 A resolution. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **54**, 558-569.

Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A., Branlant, C., et Branlant, G. (1989). Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. Biochemistry, **28**, 2586-2592.

Stancel, G. M., et Gorski, J. (1975). Analysis of cytoplasmic and nuclear estrogen-receptor proteins by sucrose density gradient centrifugation. Methods Enzymol., **36**, 166-176.

Strambini, G.B., Gabellieri E., Gonnelli M., Rahuel-Clermont, S., et Branlant G. (1998) Tyrosine quenching of tryptophane phosphorescence in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biophys. J., **74**, 3165-3172.

Sugihara, J., et Baldwin, T. O. (1988). Effects of 3' end deletions from the *Vibrio harveyi* luxB gene on luciferase subunit folding and enzyme assembly: generation of temperature-sensitive polypeptide folding mutants. Biochemistry, **27**, 2872-2880.

Tabor, S., et Richardson, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 4767.

Talfournier, F. (1998). Caractérisation de la Glycéraldéhyde 3-Posphate Déshydrogénase (GAPDH) phosphorylante isolée d'une archae et étude comparative avec les GAPDH isolées de bactéries. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I.

Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J. P., et 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**, 447-457.

Tanner, J. J., Hecht, R. M., et Krause, K. L. (1996). Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 25 Angstroms Resolution. Biochemistry, **35**, 2597-2609.

Tasayco, M. L., et Carey, J. (1992). Ordered self-assembly of polypeptide fragments to form nativelike dimeric trp repressor. Science, **255**, 594-597.

Teipel, J. W., et Hill, R. (1971). The subunit interactions of fumarase. J. Biol. Chem., **246**, 4859-4865.

Teschke, C. M., et King, J. (1992). Folding and assembly of oligomeric proteins in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol., **3**, 468-473.

Thanki, N., Zeelen, J. P., Mathieu, M., Jaenicke, R., Abagyan, R. A., Wierenga, R. K., et Schliebs, W. (1997). Protein engineering with monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM): the modelling and structure verification of a seven-residue loop. Protein Eng., **10**, 159-167.

Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. J. Mol. Biol., **151**, 261-287.

Traut, T. W., et Payne, R. C. (1980). Dependence of the catalytic activities on the aggregation and conformation states of uridine 5'-phosphate synthase. Biochemistry, **19**, 6068-6074.

Traut, T. W. (1988). Enzymes of nucleotide metabolism: the significance of subunit size and polymer size for biological function and regulatory properties. CRC Crit. Rev. Biochem., **23**, 121-169.

Traut, T. W. (1994). Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **29**, 125-163.

Trentham, D. R. (1968). Aspects of the chemistry of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., **109**, 603-612.

Trentham, D. R. (1971a). Reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. Biochem. J., **122**, 59-69.

Trentham, D. R. (1971b). Rate-determining processes and the number of simultaneously active sties of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., **122**, 71-77.

Tsai, C. J., Lin, S. L., Wolfson, H. J., et Nussinov, R. (1996). A dataset of protein-protein interfaces generated with a sequence-order- independent comparison technique. J. Mol. Biol., **260**, 604-620.

Tsai, C. J., et Nussinov, R. (1997). Hydrophobic folding units at protein-protein interfaces: implications to protein folding and to protein-protein association. Protein Sci., **6**, 1426-1437.

Tsai, C. J., Xu, D., et Nussinov, R. (1997). Structural motifs at protein-protein interfaces: protein cores versus two-state and three-state model complexes. Protein Sci., **6**, 1793-1805.

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., *et al.* (1993). Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 2355-2359.

Vonderviszt, F., Aizawa, S., et Namba, K. (1991). Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability. J. Mol. Biol., **221**, 1461-1474.

Waddle, J. J., Johnston, T. C., et Baldwin, T. O. (1987). Polypeptide folding and dimerization in bacterial luciferase occur by a concerted mechanism in vivo. Biochemistry, **26**, 4917-4921.

Wade, R. C., Gabdoulline, R. R., et Luty, B. A. (1998). Species dependence of enzyme-substrate encounter rates for triose phosphate isomerases. Proteins, **31**, 406-416.

Watson, H. C., Duée, E., et Mercer, W. D. (1972). Low resolution structure of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Nat. New Biol., **240**, 130-133.

Webb, J. L. (1963). *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. 1, Academic Press, New York and London.

Webb, J. L. (1966). *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. 2, Academic Press, New York and London.

Weber, G. (1995). Van't Hoff revisited : enthalpy of association of Protein subunits. J. Phys. Chem., **99**, 1052-1059.

Wente, S. R., et Schachman, H. K. (1987). Shared active sites in oligomeric enzymes: model studies with defective mutants of aspartate transcarbamoylase produced by site-directed mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 31-35.

Wesson, L., et Eisenberg, D. (1992). Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. Protein Sci., **1**, 227-235.

White, M. F., Fothergill-Gilmore, L. A., Kelly, S. M., et Price, N. C. (1993a). Substitution of His-181 by alanine in yeast phosphoglycerate mutase leads to cofactor-induced dissociation of the tetrameric structure. Biochem. J., **291**, 479-483.

White, M. F., Fothergill-Gilmore, L. A., Kelly, S. M., et Price, N. C. (1993b). Dissociation of the tetrameric phosphoglycerate mutase from yeast by a mutation in the subunit contact region. Biochem. J. **295**, 743-748.

Wiggins, P. M., et Van Ryn, R. T. (1987). Changes in ionic selectivity with changes in density in gels and cells. Biophys. J., **58**, 585-596.

Wiggins, P. M., et MacClement, B. A. (1987). Two states of water found in hydrophobic clefts: their possible contribution to mechanisms of cation pumps and other enzymes. Int. Rev. Cytol., **108**, 249-303.

Wiggins, P. M. (1990). Role of water in some biological processes. Microbiol. Rev., **54**, 432-449.

Wilder, R. T., Venkataramu, S. D., Dalton, L. R., Birktoft, J. J., Trommer, W. E., et Park, J. H. (1989). Catalytic mechanism and interactions of NAD+ with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: correlation of EPR data and enzymatic studies. Biochim. Biophys. Acta, **997**, 65-77.

Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E., Weber, I. T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J., et Kent, S. B. (1989). Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. Science, **245**, 616-621.

Wodak, S. J., De Crombrugghe, M., et Janin, J. (1987). Computer studies of interactions between macromolecules. Prog. Biophys. Mol. Biol., **49**, 29-63.

Woody, R. W. (1985). *Circular dichroism of peptides*, Vol. 7, Academic Press, New York.

Young, L., Jernigan, R. L., et Covell, D. G. (1994). A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. Protein Sci., **3**, 717-729.

Zhu, Z., Zapata, G., Shalaby, R., Snedecor, B., Chen, H., et Carter, P. (1996). High level secretion of a humanized bispecific diabody from *Escherichia coli*. Biotechnology (N Y), **14**, 192-196.

Zutshi, R., Brickner, M., et Chmielewski, J. (1998). Inhibiting the assembly of protein-protein interfaces. Curr. Opin. Chem. Biol., **2**, 62-66.

université HENRI POINCARÉ NANCY 1

Monsieur **ROITEL Olivier**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en ENZYMOLOGIE MOLECULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 13 janvier 2000 n° 301

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1 LE PRÉSIDENT

J. BURLET

3C-F9

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex - Tél. 83 85 48 00 - Fax 83 85 48 48

Adresse électronique : ———————— @presn1.u-nancy.fr

Résumé

Le but de notre étude était de préciser le rôle de la structure quaternaire de la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) tétramérique de *Bacillus stearothermophilus* dans la révélation de l'activité enzymatique et les propriétés de coopérativité observées lors de la fixation du cofacteur.

Notre étude a consisté à étudier les propriétés des GAPDH dimériques générées par ingénierie protéique, à les relier à leur état oligomérique et à les comparer à celles de l'enzyme tétramérique de type sauvage. A partir des structures cristallographiques des formes apo- et holoenzyme de la GAPDH de *B. stearothermophilus* connues à haute résolution et grâce à l'outil modélisation moléculaire, des mutations appropriées ont été introduites aux interfaces Q et R de la GAPDH tétramérique de type sauvage et ont permis de générer des GAPDH mutées produites sous forme strictement dimérique ou sous deux formes dimère et tétramère en équilibre.

Notre étude a montré que les dimères générés sont très probablement de type O-P, en raison du plus grand nombre de contacts interatomiques s'établissant le long de l'interface P, du plus petit nombre de résidus hydrophobes exposés au solvant et de leur meilleure affinité pour le NADP comparée à celle pour le NAD.

Les GAPDH dimériques générées sont inactives tandis que les formes tétramériques générées possèdent une activité enzymatique variable suivant les cas. Cette absence d'activité peut-être attribuée à une modification de la conformation du site actif, comparée à celle dans le tétramère, et notamment à la modification de la conformation de la boucle S qui est maintenant exposée au solvant. Cela pourrait permettre d'expliquer le positionnement et/ou l'orientation non optimal(e-s) de la partie nicotinamide du NAD par rapport au thiolate essentiel, comme l'indique la plus faible intensité de la bande d'absorption GAPDH-NAD centrée à 360 nm et l'absence de paire d'ions entre les résidus Cys149 et His176.

La conformation non optimale de la boucle S devrait aussi perturber le positionnement d'au moins 3 résidus clés, à savoir : les résidus Thr179 et Arg195, qui constituent une partie du site de fixation du groupement phosphate du G3P (site Ps) et du phosphate inorganique (site Pi) respectivement, et le résidu Asn 180 qui établit une liaison hydrogène avec l'oxygène du pyrophosphate du NAD.

La fixation du NAD par la GAPDH de type sauvage et les GAPDH tétramériques mutées peut être décrite par un modèle à au moins 2 constantes de dissociation, indiquant que ces enzymes sont en fait constituées de 2 dimères indépendants. Cela n'est pas en contradiction avec la structure cristallographique de la GAPDH de *B. stearothermophilus* qui peut être décrite comme un " dimère de dimères ". Combiné avec le modèle de l'asymétrie induite, cela signifie que la fixation du NAD par la première sous-unité induit un changement de conformation de la sous-unité voisine à l'intérieur du même dimère, tandis que la conformation de l'autre dimère reste inchangée. Les GAPDH dimériques testées conservent des propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur, ce qui indique que l'interface P est essentielle pour transmettre l'information structurale alors que la boucle S de la sous-unité symétrique par apport à l'axe *R* n'est pas directement impliquée dans cette coopérativité

L'étude de l'équilibre existant entre les formes dimérique et tétramérique du mutant (N180G-E276G) a montré une apparente non totale réversibilité de l'équilibre, qui n'est pas modifiée par la présence du cofacteur NAD.

Mots-clés : GAPDH phosphorylante, *Bacillus stearothermophilus*, fixation du cofacteur, coopérativité, structure quaternaire, modélisation moléculaire, activité enzymatique, mutagenèse dirigée.