



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Modélisation des conséquences de quelques d'acides aminés sur la stéréospécificité de déshydrogénase de muscle de lapin

Bertrand, Luc

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Modélisation des conséquences de quelques substitutions
d'acides aminés sur la stéréospécificité de la L-lactate
déshydrogénase de muscle de lapin**

BERTRAND Luc

Résumé

L'élaboration d'un modèle tridimensionnel de la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin a permis de mettre en relation la structure et la fonction de l'enzyme (Vinals, non publié). Ainsi, il est devenu possible d'émettre une hypothèse sur la cause de la stéréospécificité de la protéine (c'est-à-dire la formation exclusive de L-lactate) et le rôle de chaque résidu du site actif dans le phénomène catalytique. Les techniques de modélisation nous ont permis de proposer les modifications susceptibles de provoquer la rotation spontanée du substrat, dont la conséquence serait la production de D-lactate. Les remplacements suivants nous ont semblé les plus adéquats : l'arginine 171 est remplacée par une isoleucine et l'isoleucine 240 par une arginine. Les effets provoqués par ces modifications sur la structure et l'énergie de l'enzyme ont été modélisés par minimisation d'énergie et dynamique moléculaire. Selon les résultats obtenus, La L-LDH mutée (R171I, I240R) catalyserait, alors, la réaction suivante : Pyruvate → mélange de D- et L-lactate. Ce travail devra être complété par plusieurs expériences sur le gène cloné : la transformation de l'enzyme par mutagenèse dirigée, sa production, ainsi que les mesures d'activité de l'enzyme mutée en présence de L-lactate et de D-lactate.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 1991

Promoteur : E. Feytmans

**Modélisation des conséquences de quelques
substitutions d'acides aminés sur la stéréospécificité
de la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin**

Luc BERTRAND

1990-1991

Au terme de ce mémoire, je voudrais remercier le Professeur E. Feytmans de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir suivi au cours de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier Carla pour sa gentillesse extrême, sa disponibilité constante et sa collaboration très active et efficace au long de l'année.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du laboratoire : Eric, Etienne, Phillipe, Xavier et les autres mémorants Françoise et Florence pour leur aide et leur bonne humeur.

Toute ma reconnaissance à Madame Wattiaux et à Messieurs Delcour, Depiereux et Trausch qui ont accepté de lire ce mémoire.

Merci à tous mes amis : Claire, Florence, France, Chou, les Manu(s), Pilif pour leur soutien moral et tout particulièrement à Djony, Xavier, Cécile et Véro pour leur collaboration active.

A mes parents et à Véronique pour leur soutien permanent et spécialement durant cette année très éprouvante.

Abréviations

a:	accélération
Å:	angström 10^{-10}m)
<i>B.stéreo.</i> :	<i>Bacillus stéarothermophilus</i>
CVFF:	Consistant Valence Force Field
D-LDH:	D-lactate déshydrogénase
Dér. max.:	dérivée maximum
Dér. moy.:	dérivée moyenne
E:	enzyme
E_c :	énergie cinétique
E_m :	enzyme modifiée
E_p :	énergie potentielle
F:	force
FBP:	fructose biphosphate
G:	énergie libre
H^- :	ion hydrure
H:	enthalpie
K:	température absolue
k_b :	constante de Boltzman
Kcal:	kilocalorie
Kcat:	efficience catalytique
K_m :	constante de Michaelis Menten
L-LDH:	L-lactate déshydrogénase
m:	masse
NAD^+ :	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
$NADH$:	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
PDB:	Protein Data Bank
pont H:	pont hydrogène
Prot:	protéine
r:	rayon
RMS:	Root Mean Square
S_0 :	substrat dans son état natif
S_{180} :	substrat ayant subi une rotation de 180°
S:	entropie
sec:	seconde
T:	température absolue
V max:	vitesse maximale
VDW:	Van der Waals
ΔG_{prot} :	variation d'énergie libre de la chaîne polypeptidique lors du repliement de la protéine
ΔG_{solv} :	variation d'énergie libre du solvant lors du repliement de la protéine
ΔG_{trans} :	variation d'énergie libre lors du transfert d'un acide aminé depuis un milieu hydrophile vers un milieu hydrophobe

Table des matières

page

I. INTRODUCTION	1
I.1 Avant propos	1
I.2 La Lactate Déshydrogénase	3
I.2.1 Rôle dans le métabolisme	3
I.2.2 Lactate déshydrogénases bactériennes	4
I.2.3 Lactate déshydrogénases eucaryotiques	5
I.2.4 Mécanisme réactionnel de la L-lactate déshydrogénase	6
I.2.5 Lactate déshydrogénase de muscle de roussette	7
I.2.5.1 Structure de l'apoenzyme	7
I.2.5.2 Comparaison structurale entre l'apoenzyme et le complexe ternaire	8
I.2.5.3 Le site de fixation du coenzyme	9
I.2.5.4 Le site actif	9
I.2.6 La D-lactate déshydrogénase	11
I.2.7 Stéréospécificité de la LDH	11
I.2.7.1 Stéréospécificité du coenzyme	11
I.2.7.2 Stéréospécificité du produit	12
I.2.8 L-Lactate déshydrogénase de muscle de lapin	12
I.2.9 Mutations réalisées sur la LDH	13
I.2.9.1 LDH mutante spécifique de l'oxaloacétate	14
I.2.9.2 L-LDH de <i>B.stearotermophilus</i> . mutante spécifique d' α -cétoacides à longue chaîne aliphatique	16
I.2.9.3 Autres mutations de la LDH	17
I.2.9.4 Conclusions	19

I.3 La modélisation de structures tridimensionnelles	20
I.3.1 Energie libre d'une protéine	20
I.3.2 Energie libre et énergie potentielle	21
I.3.3 Le Force Field	22
I.3.4 La minimisation d'énergie	25
I.3.4.1 Méthode de minimisation d'énergie	26
I.3.5 La dynamique moléculaire	26
I.3.6 Conclusions	29
I.4. Idée générale du travail	30

II MATERIEL ET METHODES	32
--------------------------------	-----------

II.1 Matériel informatique	32
II.1.1 Banques de données	32
II.1.2 Logiciels de modélisation	33
II.1.2.1 INSIGHT II	33
II.1.2.2 DISCOVER	33
II.2 Remplacements de résidus	34
II.3 Déplacement du substrat	35
II.4 Minimisation d'énergie	35
II.5 Dynamique moléculaire	37
II.6 Interprétation des résultats	38

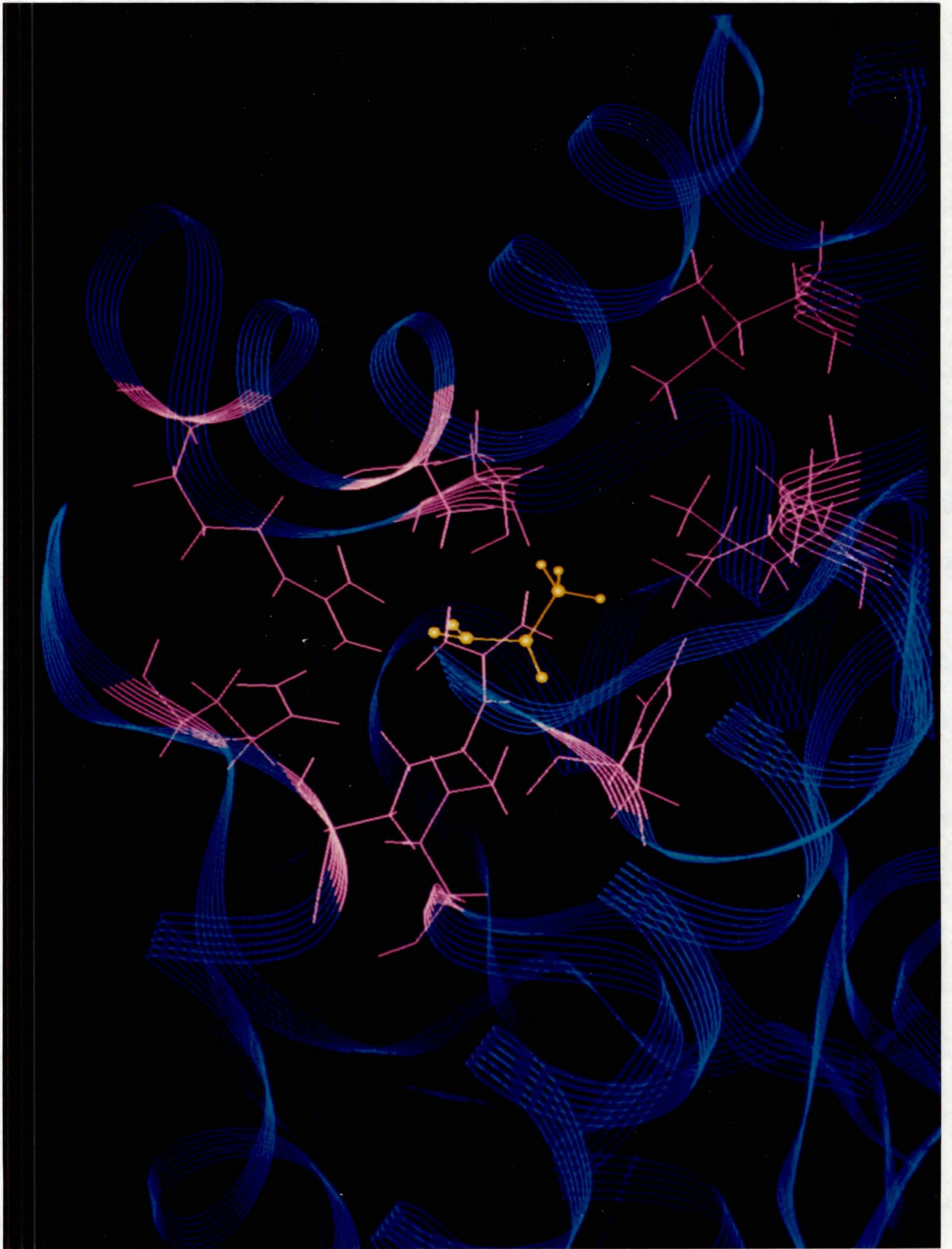
III RESULTATS ET DISCUSSIONS	40
-------------------------------------	-----------

III.1 Caractéristiques générales du modèle de la LDH de muscle de lapin	40
III.2 Modèles non modifiés	40
III.2.1 Les modélisations	41

III.2.2 Comparaison structurelle des deux sites actifs	41
III.2.3 Comparaison des énergies des deux modèles	43
III.2.3.1 Comparaison de l'énergie potentielle totale par molécule	43
III.2.3.2 Comparaison des énergies potentielles par résidu	44
III.3 Modélisation des enzymes modifiées	46
III.3.1 Remplacements de deux résidus	46
III.3.2 Les modélisations	47
III.3.3 Comparaison structurelle des deux sites actifs modifiés	47
III.3.4 Comparaison des deux modèles modifiés	49
III.3.4.1 Comparaison de l'énergie potentielle totale par molécule	49
III.3.4.2 Comparaison de l'énergie potentielle par résidu	50
III.4 Comparaison des résidus remplacés	52
III.5 Vérification des modèles par dynamique moléculaire	52
III.5.1 Minimum local ou minimum global ?	53
III.5.2 Tendances du substrat dans les différents sites actifs	54
III.5.3 Conclusions	55

IV PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS	56
---------------------------------------	-----------

Bibliographie	58
----------------------	-----------



I. INTRODUCTION

I.1 Avant propos

Les protéines, macromolécules biologiques les plus abondantes, se retrouvent en tous lieux cellulaires. Il en existe une très grande variété autant structurale que fonctionnelle. Cette richesse leur donne une importance capitale dans le règne du vivant. Elles servent aussi bien à la construction des éléments d'un organisme qu'à la production de l'énergie nécessaire à ses processus vitaux. Parmi les protéines, les enzymes catalysent de manière spécifique des réactions biochimiques telles que la dégradation des aliments et la synthèse de molécules complexes, ou transportent des éléments vers leurs sites d'utilisation ; les anticorps protègent l'être vivant des corps étrangers ; les protéines de structure sont responsables du maintien de l'intégrité des différents compartiments cellulaires ainsi que des organes.

La clef de l'énigme fonctionnelle d'une protéine se situe au niveau de sa structure tridimensionnelle. Malheureusement, le nombre de structures protéiques connues ne représente qu'une petite partie des protéines (Acharya *et al.*, 1990). Les causes de ce phénomène résident dans la technique employée habituellement pour révéler les structures spatiales, c'est-à-dire la cristallographie aux rayons X. Cette méthode est lente et coûteuse. En outre, elle implique la cristallisation de la protéine, étape limitante dans le processus (Glusker et Trueblood, 1985).

Actuellement, l'informatique et les techniques de modélisation de protéines permettent de résoudre en partie ces problèmes. En effet, il est parfois possible d'obtenir, en un laps de temps assez court, le modèle d'une enzyme non cristallisée. Bien qu'assez contraignante, la modélisation procure une image dynamique de la molécule. Ce caractère non figé permet, par exemple, la simulation des effets provoqués par des mutations ponctuelles au sein de la chaîne polypeptidique.

Le but de ce mémoire est de modéliser le changement de la stéréospécificité de la **L-LACTATE DESHYDROGENASE (L-LDH) de muscle de lapin** à partir du modèle tridimensionnel réalisé dans l'unité de Biologie Quantitative (Vinals, non publié). Les remplacements de certains résidus au sein du site actif de l'enzyme sont réalisés en vue de prédire les modifications d'activité stéréospécifique.

L'une des perspectives de ce travail est de fournir des données susceptibles de tester expérimentalement la validité du modèle conçu. En outre, les résultats de la modélisation fournissent un nombre important de renseignements à propos du mécanisme réactionnel de la L-LDH et de sa transformation éventuelle.

Finalement, ce travail met en évidence les enjeux de l'ingénierie des protéines. Plusieurs milliers d'enzymes ont été découvertes à ce jour. Parmi elles, quelques unes sont déjà utilisées à l'échelle industrielle. Les techniques biochimiques et génétiques actuelles permettent la transformation de ces protéines existantes afin d'en modifier les propriétés catalytiques, physiques et chimiques.

La transformation des enzymes peut être réalisée à l'aide de différentes techniques. Tout d'abord, des traitements chimiques peuvent modifier les propriétés intrinsèques d'une protéine. Par exemple, la glycosylation d'exoenzymes augmente leur stabilité. Ensuite, et surtout, le changement ponctuel et précis de différents résidus peut créer de nouvelles activités enzymatiques ou du moins modifier celles déjà existantes. Dans le futur, il est même envisageable de fabriquer des enzymes totalement synthétiques (Mutter, 1985 et 1988).

La modélisation et l'ingénierie des protéines, deux domaines de la recherche actuelle sont, je pense, vouées à un très bel avenir scientifique et technologique. J'espère vous en persuader à travers ce travail.

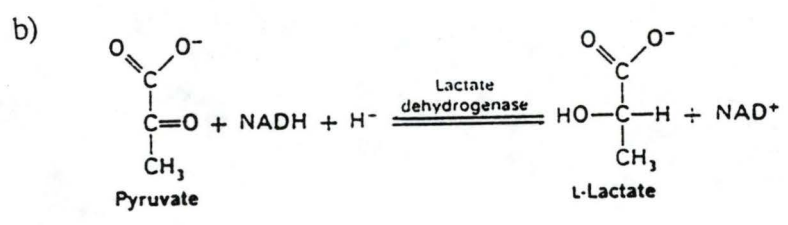
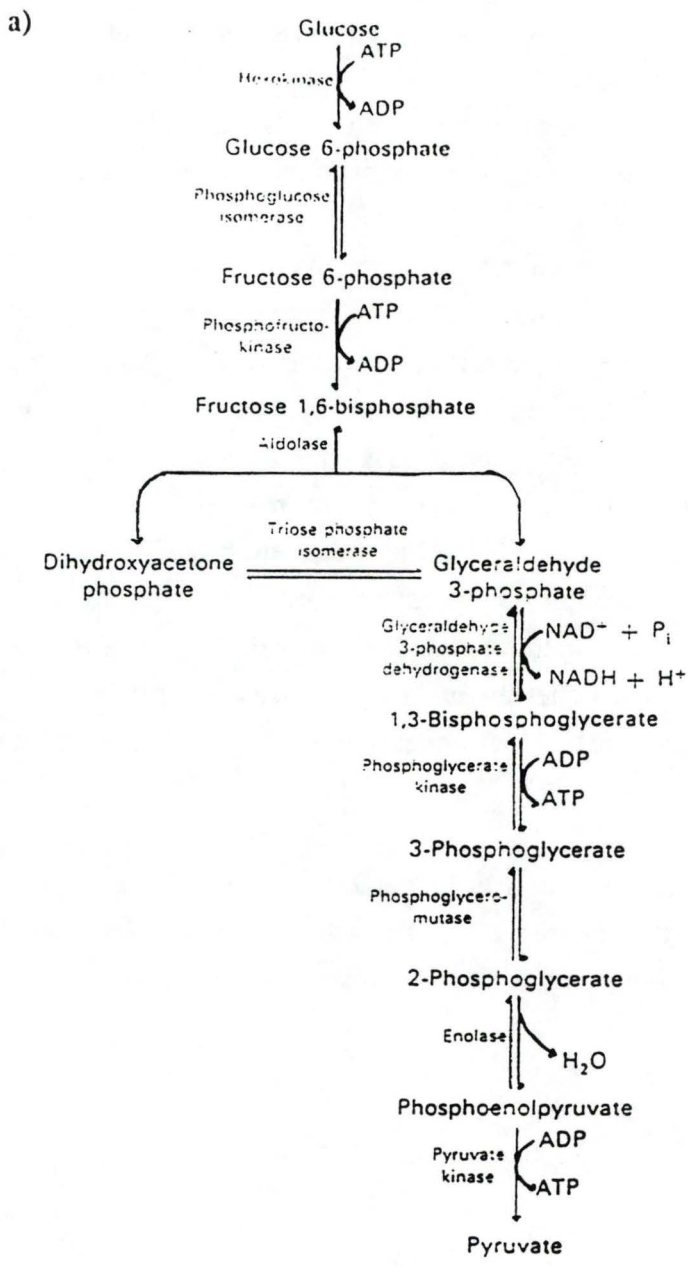


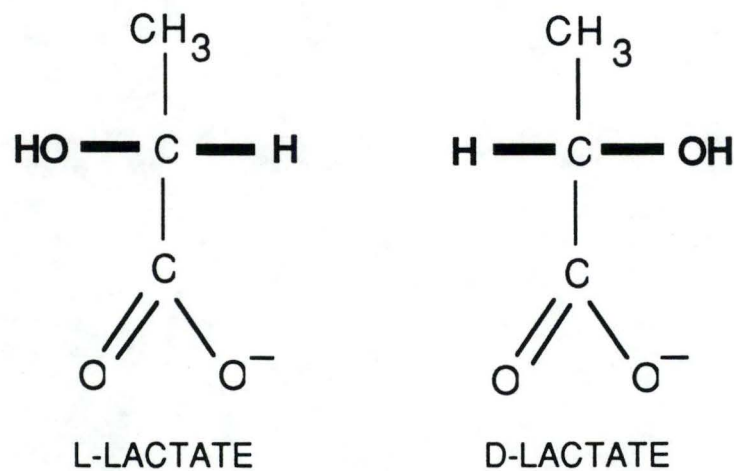
Figure 1

- a) La voie glycolytique (Stryer, 1988)
- b) La réduction du pyruvate en lactate par la LDH dans la fermentation lactique (Stryer, 1988).

I.2 La Lactate Déshydrogénase

La lactate déshydrogénase, enzyme oxydoréductrice, réduit le pyruvate en lactate à l'aide d'un coenzyme, le nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme réduite (NADH). De la même manière, elle oxyde le lactate en pyruvate à l'aide du NAD⁺ (le coenzyme sous sa forme oxydée). Son fonctionnement ne nécessite pas la présence d'un cofacteur. Le sens de la réaction dépend du pH du milieu. Le pyruvate est transformé en lactate à un pH proche de 7, la réaction inverse se produisant en milieu basique.

La LDH est une enzyme stéréospécifique. La L-LDH ne produit qu'un seul des stéréoisomères du lactate, le L-lactate, tandis que la D-LDH ne reconnaît que le D-lactate:



La L-LDH est active sous sa forme tétramérique; chaque monomère possède un site actif fonctionnel indépendant. Le poids moléculaire du tétramère est proche de 140.000 Daltons (Holbrook *et al.*, 1975).

La majorité des D-LDH sont actives sous forme dimérique dont le poids moléculaire se situe aux environs de 75.000 Daltons (Garvie, 1980). Très peu de choses sont connues à leur sujet.

I.2.1 Rôle dans le métabolisme (Stryer, 1988)

La conversion du glucose en pyruvate par la voie glycolytique provoque la réduction du NAD⁺, forme oxydée du coenzyme, en NADH (figure 1). Cette transformation a lieu dans toutes les cellules de tous les organismes vivants.

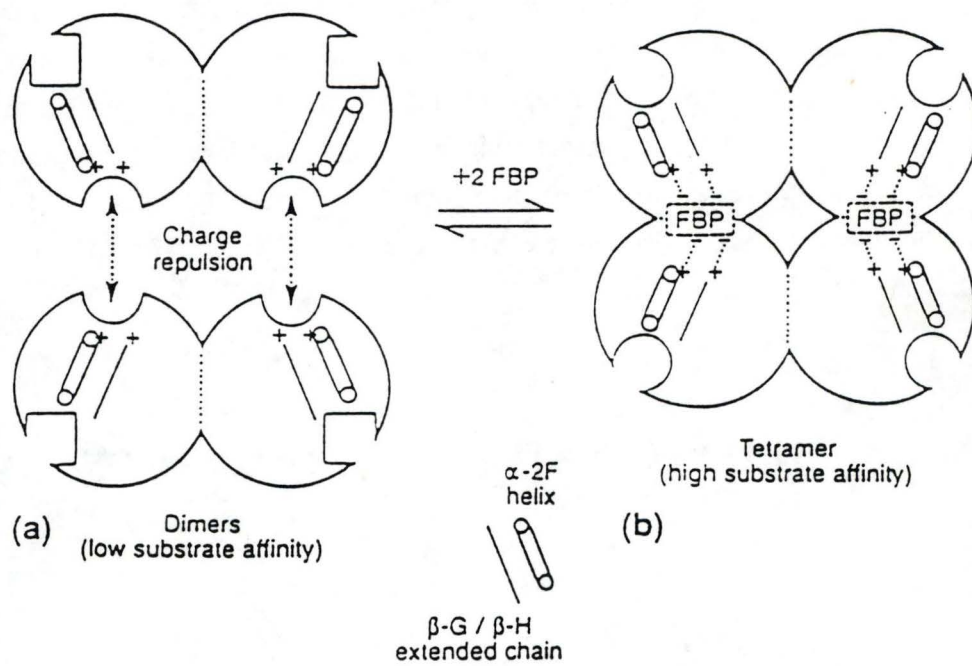


Figure 2

Activation de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* par le fructose-1,6-biphosphate (Clarke *et al.*, 1989).

Par contre, le pyruvate peut être utilisé de différentes manières :

- La majorité de l'énergie est récupérée en condition d'aérobiose via le cycle de Krebs. Pour cela, le pyruvate est oxydé en acétyl coenzyme A, substrat initial de ce cycle oxydatif. Le NAD⁺, nécessaire à la perpétuation du cycle, est régénéré par la chaîne respiratoire des mitochondries.

- Chez certains microorganismes, ou dans les cellules d'êtres vivants supérieurs lorsque la quantité d'oxygène est faible, le pyruvate est réduit en D- ou L-lactate (figure 1). Cette conversion du glucose en lactate est appelée la fermentation lactique. **La D- ou la L-lactate déshydrogénase**, responsable de la dernière réaction de cette glycolyse anaérobie, permet par exemple la régénération du NAD⁺ dans les muscles en absence d'oxygène, lors d'une activité intense (Holbrook *et al.*, 1975).

Cette régénération se réalise, chez les levures, par fermentation alcoolique en transformant le pyruvate en acétaldéhyde puis en éthanol. La première réaction est catalysée par la pyruvate décarboxylase, et la seconde par l'alcool déshydrogénase.

La lactate déshydrogénase (D- ou L-) se retrouve dans la quasi totalité du règne animal. Au niveau des procaryotes, elle est un témoignage du passé, lorsque l'atmosphère était réductrice. Au niveau des eucaryotes, elle est utilisée comme "dépannage" en cas d'absence d'oxygène.

I.2.2 Lactate déshydrogénases bactériennes

Les bactéries à fermentation lactique sont nombreuses. La majorité des *Streptococcus*, des *Pediococcus*, des *Lactobacillus*, quelques *Bacillus* et entérobactéries en font partie (Garvie, 1980).

La quasi totalité de ces procaryotes ne produisent qu'un des stéréoisomères du lactate. Un mélange racémique ne se produit que très rarement.

La plupart des L-LDH bactériennes sont allostériquement régulées par le fructose 1,6 biphosphate ou FBP (Clarke *et al.*, 1985 A). Comme le montre la figure 2, les dimères de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*, à faible affinité pour le substrat, ne peuvent s'associer en tétramère. Cette difficulté d'association est due à la répulsion, deux par deux, de leurs quatre sites de fixation du FBP chargé positivement. Ces charges font partie de l'extrémité de deux structures secondaires, une hélice α (α 2F) et un feuillet β (β -g et β -h), dont les autres extrémités se situent près du site actif. Lorsque les dimères sont mis en présence de FBP, ce dernier neutralise les charges. Il stabilise le tétramère et provoque un réarrangement des structures secondaires impliquées dans le site actif.

roussette	A T L K D K L I G H L A T S O E P R S Y
souris	S T V K E Q L I Q N L V P E D K L S R
B Stearo	M K N N G G
lactob. Casei	A S I T D K D H

R	N K I T V V G V G A V Q M A C A I S I L
S	C K I T V V D V G D V G M A C A I S I L
B	A R V V V I G A G F V G A S Y V F A L M
L	O K V I L V G D G A V G S S Y A F A M V

R	M K D L A D E V A L V D V M E D K L K G
S	L K G L A D E L A L V D A D T D K L R G
B	N O G I A D E I V L I D A N E S K A I G
L	L O G I A Q E I G I V D I F K D K T K G

R	E M M D L Q H G B L F L H T A K I V S G
S	E A L D L Q H G S L F L S T P K I V F G
B	D A M D F N H G K V F A P K P V D I W D
L	D A I D L S N A L P F T S P K K I Y S A

R	K D Y S V S A G S K L V V I T A G A R Q
S	K D Y N V S A N S K L V I I T A G A R M
B	Y D D C R D A D L V V I C A G A N
L	E Y S D A K D A D L V V I T A G A P K

R	O E G E S R L N L V Q R N V N I F K F I
S	V S G O T R L D L L Q R N V A I M K A I
B	D L V D K N I A I F R S I
L	O P G E T R L D L V N K N L K I L K S I

R	I P N I V K H S P D C I I L V V S N P V
S	V P G V I Q N S B D C K I F V V T N P V
B	V E S V M A S G F Q G L F L V A T N P V
L	V D P I V G S G F N L I F L V A A N P V

R	D Y L T Y V A W K L S G L P M H R I I G
S	D I L T Y V V W K I S G F P V G R V I G
B	D I L T Y A T W K F S G L P H E R V I G
L	D I L T Y A T W K L S G F P K N R V V G

R	S G C N L D S A R F F R Y L M G E R L G V
S	S G C H L D S A R F F R Y L I G E K L G V
B	S G T I L D T A R F R F L L G E Y P S V
L	S G T S L D T A R F R O S I A E M V N V

R	H S C S C H G W V I G E H G D S V P S V
S	M P T S C H G W V L G E H G D S S V P I
B	A P Q N V H A Y I I G E H G O T E L P V
L	D A R S V H A Y I M G E H G O T E F P V

R	W S G M N V
S	W S G V N V
B	W S G A Y I
L	W S H A N I

Figure 3

Alignement de structure du domaine de fixation du coenzyme de quatre L-LDH provenant du muscle de roussette, de testicule de souris, de *Bacillus stéarothermophilus* et de *Lactobacillus casei*. Les encadrés gris représentent les zones de structures conservées dans les quatre LDH simultanément. Remarquons le bras amino-terminal (résidus 1 à 20) présent seulement chez les eucaryotes. L'alignement a été réalisé à l'aide de la méthode Depiereux et Feytmans (1991).

Le tétramère possède alors une affinité cinquante fois plus élevée pour le pyruvate (Clarke *et al.*, 1989). Cette régulation rend l'enzyme dépendante de la concentration en glucose. En effet, la présence de glucose entraîne la formation de FBP qui stimule la L-LDH et donc provoque la production de L-lactate, alors que l'absence de FBP, due à la pénurie de glucose, inhibe la L-LDH.

I.2.3 Lactate déshydrogénases eucaryotiques

La quasi totalité des LDH eucaryotiques produisent du L-lactate. Seuls quelques organismes primitifs (certains mollusques, annélides et coelentérés) possèdent une D-LDH et pas de L-LDH. Ces D-LDH sont encore mal connues.

Il existe diverses formes moléculaires, ou isozymes, de la L-lactate deshydrogénase chez les eucaryotes. Les cinq isozymes tétramériques principaux sont constitués par l'assemblage de 4 monomères provenant de deux gènes différents. L'expression de ces gènes est différente et spécifique pour chaque type de tissu (Holbrook *et al.*, 1975).

Le monomère **M** (ou **A**), pour "Muscle", prédomine dans les muscles striés squelettiques, alors que le monomère **H** (ou **B**), pour "Heart", est le principal monomère présent dans le coeur. L'hybridation entre ces deux formes produit cinq tétramères différents : H₄, H₃-M, H₂-M₂, H-M₃ et M₄. Des études immunologiques et génétiques montrent que la similarité au niveau de la séquence en A.A. entre les monomères identiques de différentes espèces est plus élevée qu'entre la forme H et M d'une même espèce (Sass *et al.*, 1989).

Il existe, en outre, un gène supplémentaire codant pour une LDH **X** (ou **C**) que l'on ne trouve que dans les testicules des mammifères et des oiseaux. Malgré l'hybridation *in vitro* possible avec d'autres types de monomères, cette isozyme est génétiquement et immunologiquement différente des deux autres formes (Li *et al.*, 1983).

D'autres LDH se retrouvent dans certains tissus de quelques poissons :

- La LDH E se situe dans les tissus nerveux des poissons téléostéens.
- La LDH F se trouve dans le foie des poissons du genre morue.

Dans toutes les LDH d'eucaryotes, il existe un site de fixation d'un anion par monomère, homologue au site de fixation du FBP des L-LDH de procaryotes (Clarke *et al.*, 1985 A). Ce site de fixation stabilise le tétramère en présence d'ions négatifs. De plus, l'extrémité N-terminale, formant un bras à l'extérieur de la protéine, favorise également la stabilisation (Adams *et al.*, 1973). Une représentation des domaines structuraux impliqués dans la formation du tétramère de la LDH de porc est donnée à la figure 8.

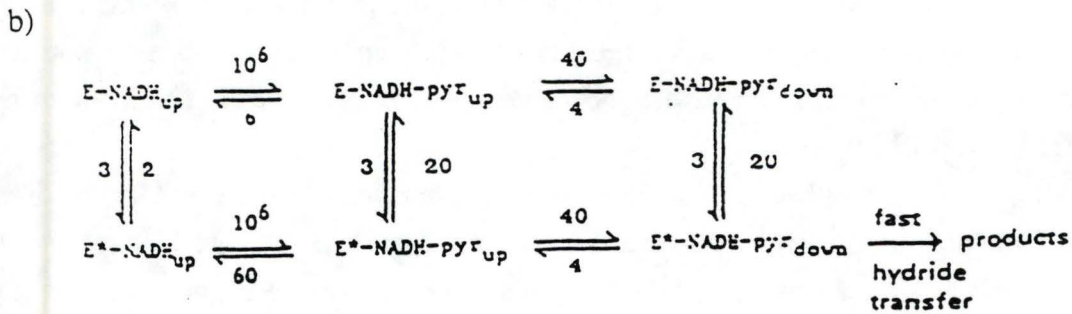
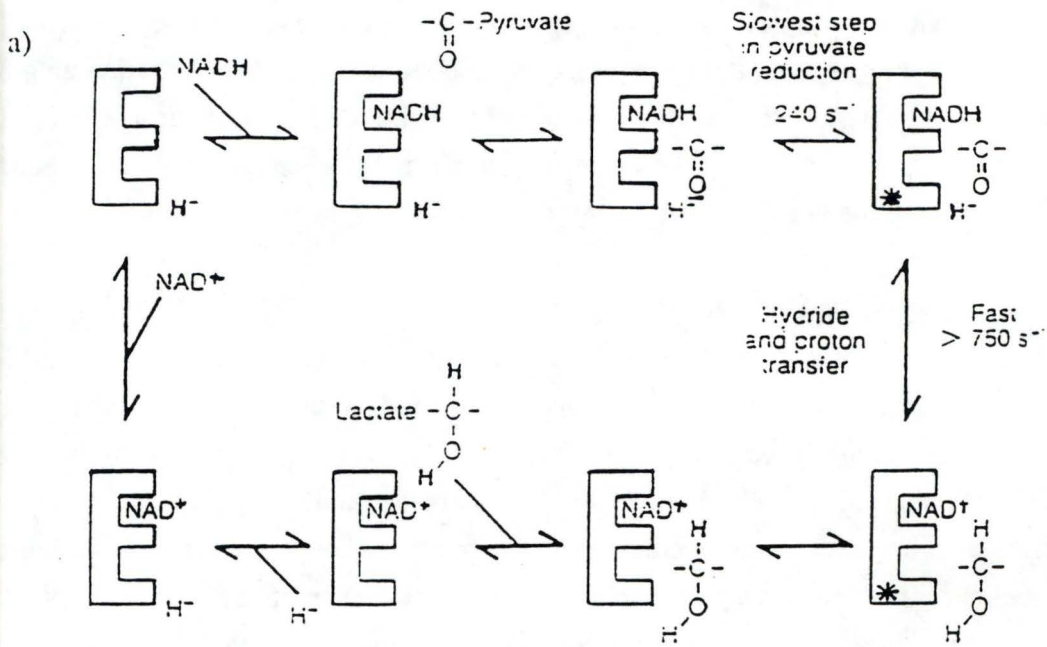


Figure 4

a) Mécanisme ordonné "BiBi" de la L-LDH de *Bacillus stéaro*. Le cycle représente la réaction à pH 7. Les étapes marquées d'une astérisque sont caractérisées par des changements structuraux importants (Clarke *et al.*, 1989).

b) Modèle du mécanisme réactionnel décrivant la relation entre les changements de la structure protéinique. L'étape limitante, caractérisée par une astérisque, est la réorganisation structurale qui suit la fermeture, up \rightarrow down, de la boucle (Clarke *et al.*, 1985 B).

Un alignement de séquences de plusieurs L-LDH de vertébrés et de procaryotes montre bien l'importante similarité (deux résidus ayant des propriétés physico-chimiques semblables sont dits similaires) qui existe entre elles (figure 3). Il permet de supposer qu'il existe un degré de conservation structurel élevé. En effet, le changement de très peu d'acides aminés entraîne plutôt une modification des propriétés catalytiques qu'un changement conformationnel important (Eventoff *et al.*, 1977).

I.2.4 Mécanisme réactionnel de la L-lactate déshydrogénase

Le mécanisme réactionnel de toutes les L-LDH est de type ordonné BiBi (Holbrook *et al.*, 1975) [figure 4]. Dans ce type de cinétique, l'enzyme s'associe avec deux substrats dans un ordre bien précis. Après réaction, les deux produits sont libérés, eux aussi, de manière ordonnée. Adams *et al.* (1973) ont mis en évidence ce mécanisme pour la L-LDH de muscle de roussette, et Zewe et Fromm (1962 et 1965) pour la L-LDH de muscle de lapin.

Le mécanisme réactionnel de la L-LDH, proposé par Clarke *et al.* en 1985 [B], est le suivant (figure 4) :

- 1) Le NADH se lie à l'apoenzyme (la protéine sans substrat ni coenzyme).
- 2) Le pyruvate s'associe ensuite à ce complexe binaire.
- 3) C'est à ce moment là qu'une "boucle", composée des résidus 96 à 117 et se situant à l'extérieur du site de fixation du coenzyme, change de conformation et se replie, empêchant la sortie du NADH. Cet état est appelé "down".
- 4) Le complexe ternaire subit un réarrangement très lent qui permet le transfert de l'ion hydrure du NADH sur le carbone du carbonyle du pyruvate (voir le site actif). C'est l'étape limitante du mécanisme.
- 5) Une fois la réaction terminée, la boucle revient à sa conformation de départ et le lactate peut sortir. Il est suivi par le NAD⁺. L'enzyme reprend alors sa conformation "inactive".

Ce modèle est valable également pour la réaction inverse.

Plusieurs structures cristallographiques de L-LDH de vertébrés, avec la boucle dans les deux états conformationnels, permettent une description détaillée du déplacement. Par contre, le réarrangement ultérieur, quoique expliqué dans le cas de la lactate déshydrogénase de coeur de porc, est structurellement indéfini.

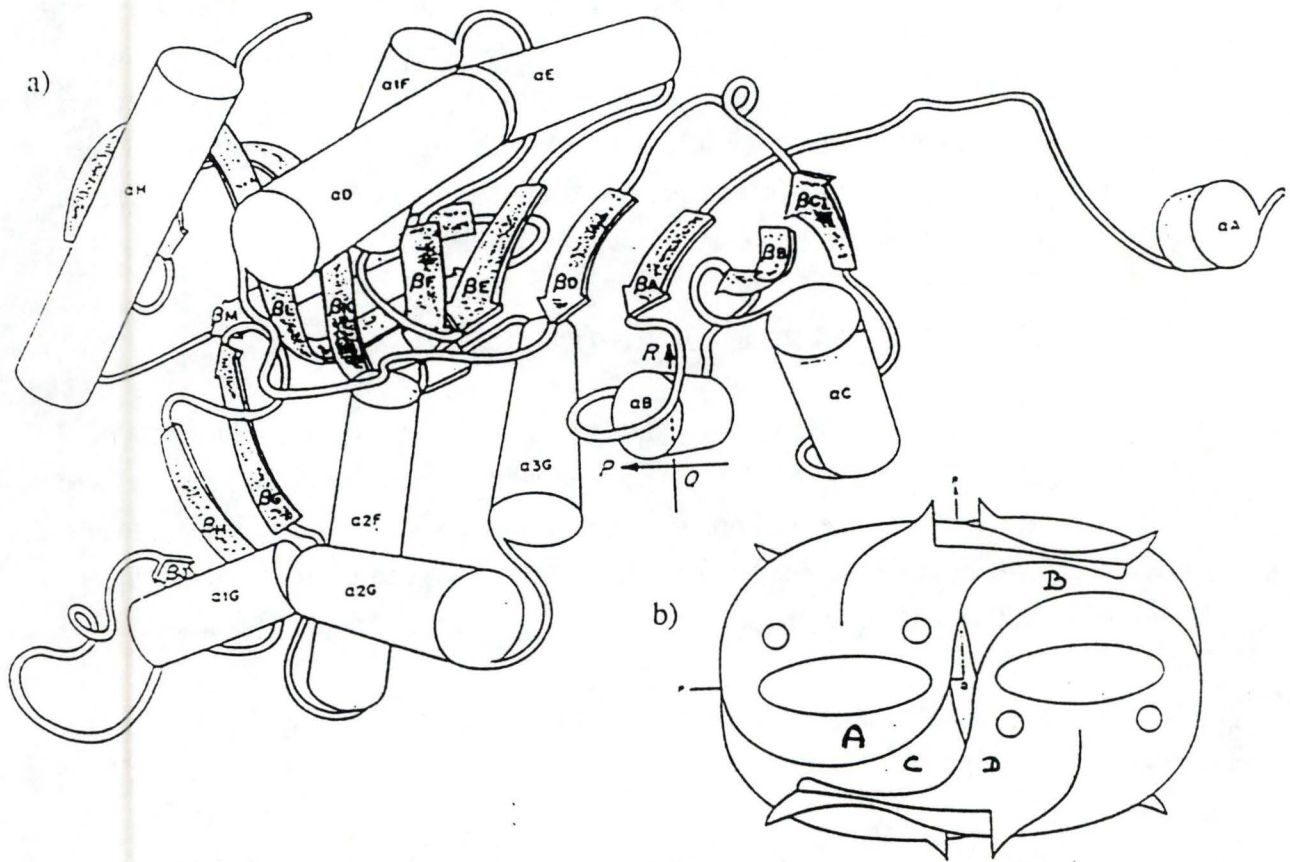


Figure 5

a) Diagramme schématique de l'apoenzyme de L-LDH de muscle de roussette (Abad-Zapataro *et al.*, 1987).

b) Représentation schématique de la structure quaternaire de l'apoenzyme de L-LDH de muscle de roussette. Chaque monomère est représenté par une lettre (Abad-Zapataro *et al.*, 1987)).

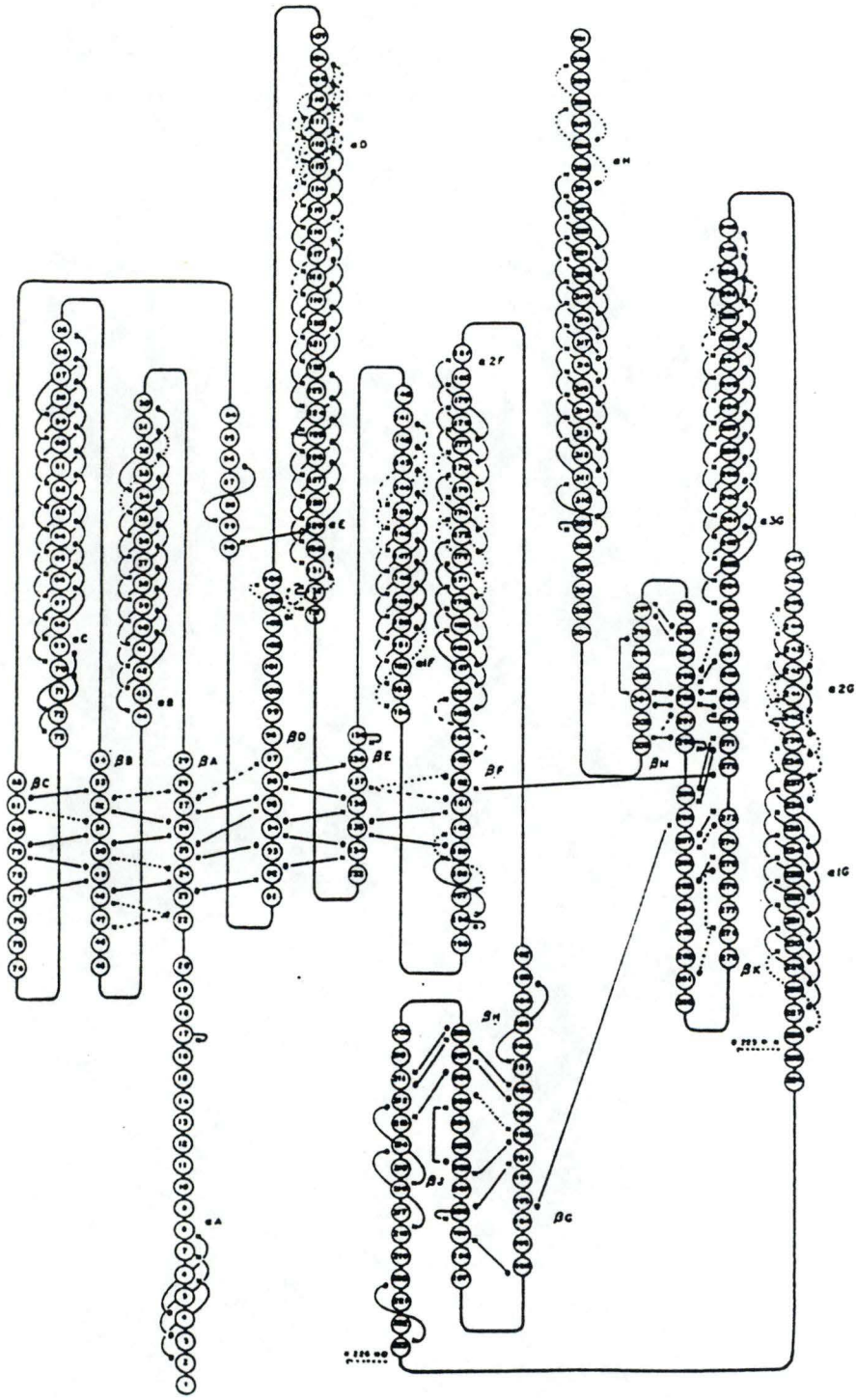


Figure 6

Représentation schématique des différentes structures secondaires de la L-LDH de muscle de roussette. Les cercles représentent les résidus, les lignes entre les cercles représentent les ponts hydrogènes. Le domaine de fixation du coenzyme se compose des 200 premiers résidus, le reste constitue le domaine catalytique (Holbrook *et al.*, 1975).

I.2.5 Lactate déshydrogénase de muscle de roussette

Les coordonnées cristallographiques du complexe ternaire de la L-LDH de muscle de roussette ont été utilisées comme point de départ pour la modélisation de la L-LDH de muscle de lapin (Vinals, non publié).

La L-lactate déshydrogénase de muscle de roussette est un tétramère d'un poids moléculaire de 140.000 Daltons. Elle est formée de 329 acides aminés par monomère. L'apoenzyme a été cristallographiée par Adams *et al.* en 1970 à une résolution de 2,8 Å, et ensuite raffinée par Abad-Zapatero en 1987 à une résolution de 2,0 Å.

Le NAD⁺ peut agir comme inhibiteur de la L-LDH lorsque la réaction se fait dans le sens pyruvate → lactate. Le pyruvate et le NAD⁺ peuvent être liés de manière covalente et empêcher toute réaction. L'immobilisation cinétique de ce complexe ternaire L-LDH-pyruvate-NAD⁺ permet sa cristallisation. La première structure cristallographique de ce complexe ternaire a été réalisée par Smiley *et al.* à une résolution de 5,0 Å (1971). Par la suite, cette résolution a été ramenée à 3,0 Å (Adams *et al.*, 1973). D'autres inhibiteurs, l'oxalate et l'oxamate, ont aussi été employés pour fournir deux autres structures tridimensionnelles du complexe ternaire (Adams *et al.*, 1973). Les conformations des trois complexes ternaires sont quasiment identiques (White *et al.*, 1976). Les différences obtenues ne sont pas significatives.

Les études qui vont suivre concernent particulièrement la L-LDH de muscle de roussette. Le pourcentage de similarité très élevé entre les L-LDH d'organismes supérieurs permet de les appliquer à la majorité des L-LDH.

I.2.5.1 Structure de l'apoenzyme

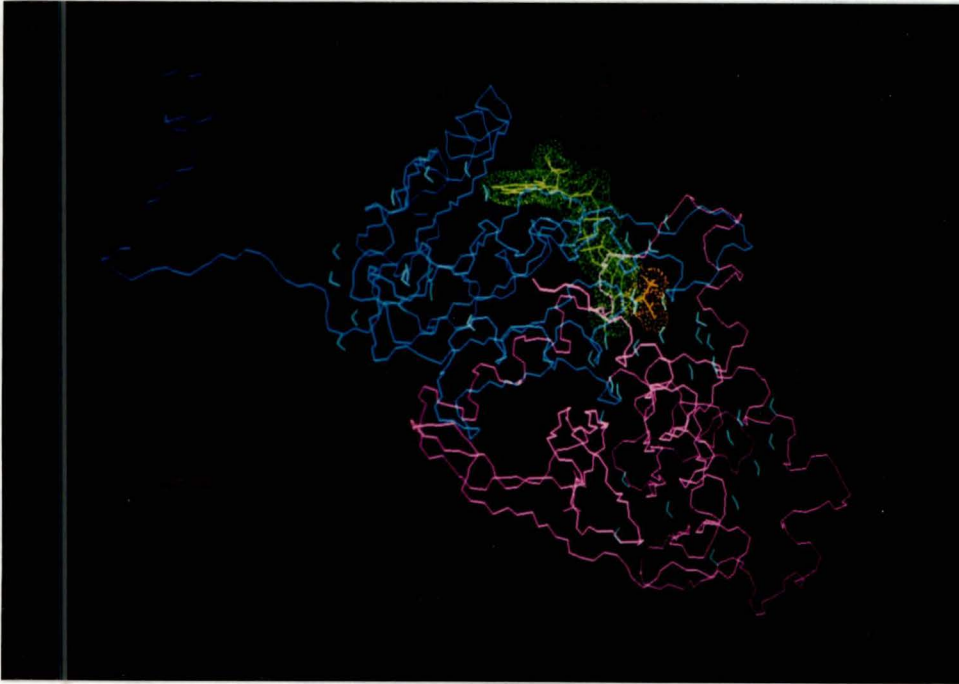
La structure de l'apoenzyme de la L-LDH de muscle de roussette ainsi que la représentation schématique des liens entre les structures secondaires sont illustrés à la figure 5 et 6 et permettent de constater plusieurs faits :

1) 40 % des résidus sont sous la forme d'hélices et 23 % ont une conformation en chaînes β (Holbrook *et al.*, 1975). Ces dernières forment 3 plans différents :

- Un plan parallèle de 5 chaînes β : βA à βE .
- Un plan antiparallèle de 4 chaînes : βF et βK à βM .
- Un autre plan antiparallèle de 4 chaînes : βG à βJ .

Deux courtes hélices $\alpha 3-10$ se situent l'une après βC , l'autre après βJ (Abad-Zapatero *et al.*, 1987).

a)



b)

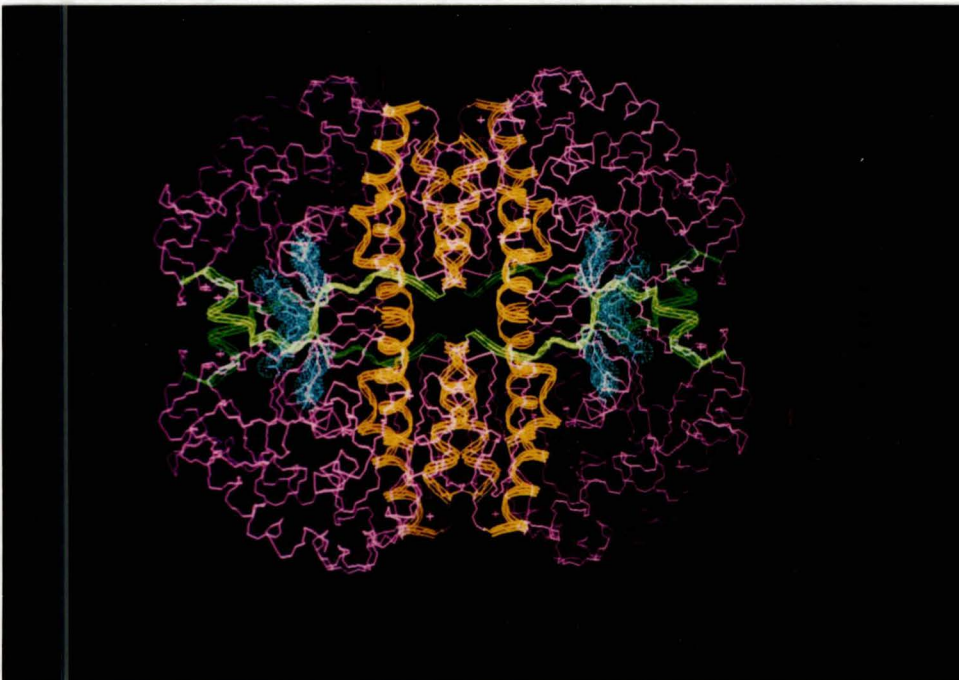
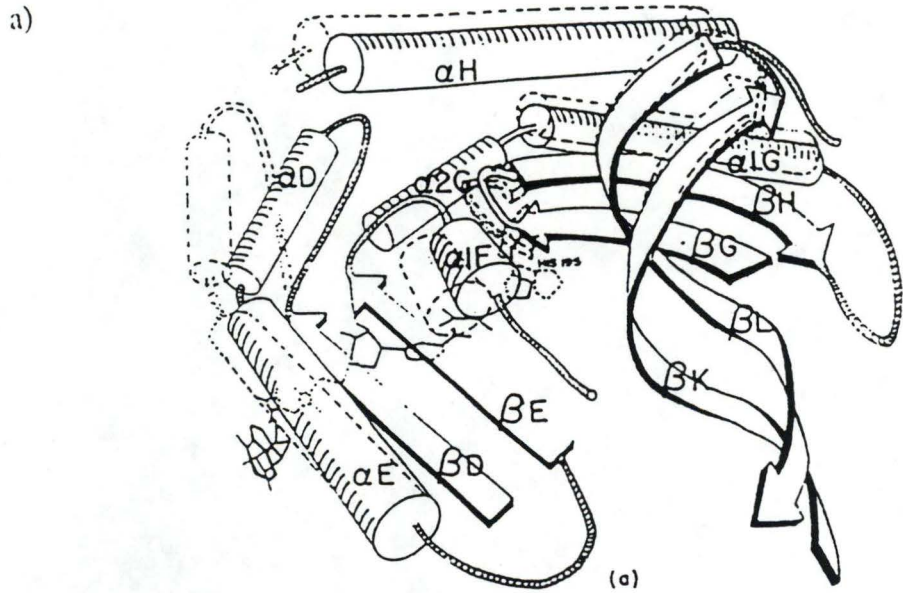


Figure 7

- a) La L-LDH de muscle de roussette se compose d'un site de fixation du coenzyme (en bleu) et d'un site catalytique (en mauve). Le coenzyme est en vert, le substrat en orange.
- b) Différentes interactions entre monomères dans la structure de la L-LDH de muscle de roussette. Le bras amino-terminal est en vert. Le site de fixation anionique est en bleu. Les trois chaînes α sont en orange.



b)

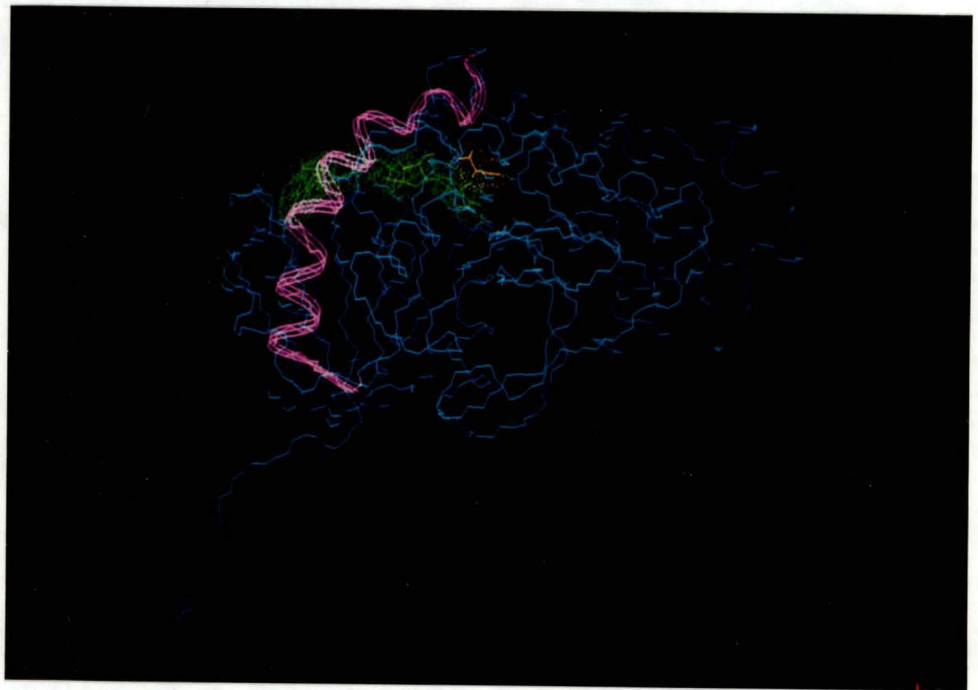


Figure 8

a) Changements conformationnels entre l'apoenzyme (en trait pointillé) et le complexe ternaire (en trait plein) de la L-LDH de muscle de roussette (White *et al.*, 1976).

b) Représentation de la boucle (en mauve) qui se referme sur le complexe ternaire dans le modèle de la L-LDH de muscle de lapin. Le NADH est en vert, le pyruvate en orange.

2) Le monomère est de forme globulaire, excepté les 20 résidus amino-terminaux. La première partie de l'enzyme, formée des 150 résidus amino-terminaux allant de αA à βF , possède la plus grande proportion de structures secondaires régulières. Il s'agit du domaine de fixation du coenzyme. La seconde partie, formée de structures secondaires moins précises, est le domaine catalytique. Une image tridimensionnelle de ces domaines se trouve à la figure 7a.

3) Les interactions entre structures tertiaires sont importantes pour la tétramérisation de la LDH (figure 7b et 5). Chaque monomère est caractérisé par une lettre (A,B,C et D) correspondant à la figure 5.

Tout d'abord, les chaînes $\alpha 3G$, αB et αC du monomère "A" interagissent avec les structures correspondantes du monomère "B", c'est-à-dire respectivement αC , αB et $\alpha 3G$. La même interaction se réalise entre les sous-unités "C" et "D", et se retrouve dans beaucoup de protéines (Miller, 1989).

Ensuite, un plan β est formé par les résidus 7 à 9 du bras amino-terminal de "A" et les résidus 301 et 304 de "D", le bras de "D" interagissant également avec les mêmes résidus de "A". Cette structure se retrouve évidemment entre "B" et "C".

Finalement, un site de fixation d'ions, se situant entre l'hélice $\alpha 2F$ et la chaîne βG , participe à l'union entre "A" et "C" et entre "B" et "D". Des ions sulfates y interagissent avec l'arginine 173 et l'histidine 188. Cette région correspondrait au site de fixation du fructose-1,6-biphosphate des LDH procaryotiques (Adams *et al.*, 1973).

Selon Adams, les dimères se formeraient par le compactage des hélices α . Le tétramère se stabiliserait à la fois grâce aux bras amino-terminaux et aux sites de fixation ionique. Malgré les travaux réalisés dans le domaine de la tétramérisation de la lactate déshydrogénase, certaines zones d'ombre subsistent.

I.2.5.2 Comparaison structurale entre l'apoenzyme et le complexe ternaire

White *et al.* (1976) ont comparé la structure de l'apoenzyme de la LDH de muscle de roussette avec celle du complexe ternaire de la même enzyme. Les structures quaternaires de l'apoenzyme et du complexe ternaire sont quasiment identiques. Par contre, il existe un changement conformationnel significatif dans la région du site de fixation du coenzyme (figure 8). La boucle et l'hélice αD se déplacent assez fortement pour se refermer sur le coenzyme et le substrat.

D'autres variations moins importantes apparaissent au niveau des hélices $\alpha 1F$, αH , αE et $\alpha 1G$. Un "turn", entre βG et βH , où se trouve l'histidine nécessaire à la réaction,



Figure 9

Représentation schématique du site de fixation du coenzyme (Holbrook *et al.*, 1975).

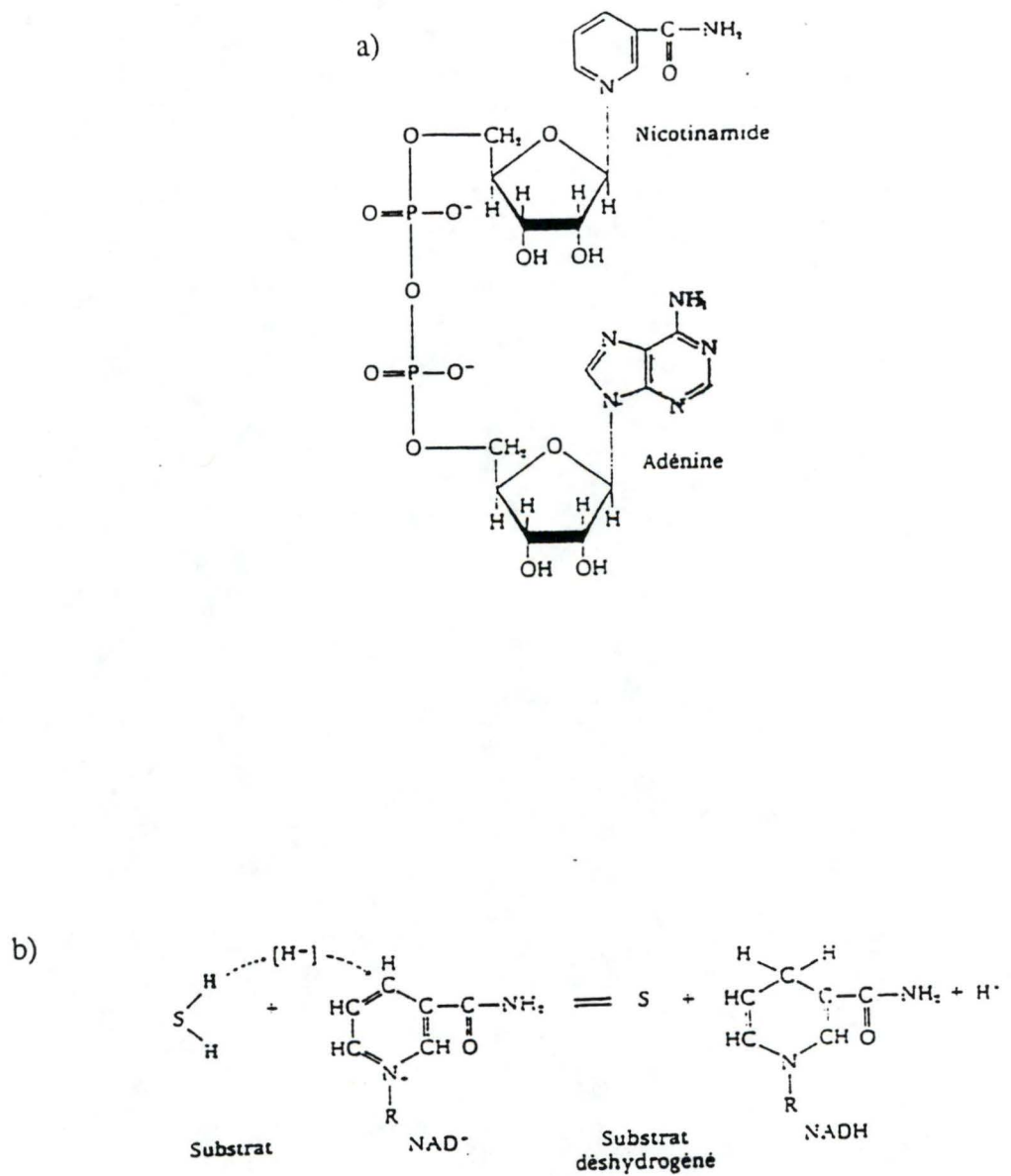


Figure 10

a) Structure du NAD^+ . Il contient deux unités nucléotidiques, chacune formée d'une base azotée (nicotinamide ou adénine), d'un sucre à cinq carbones (D-ribose) et d'un groupement phosphate (Lehninger, 1972).

b) Réaction générale montrant comment le NADH agit comme coenzyme dans les réactions enzymatiques de déshydrogénation (Lehninger, 1972).

subit lui aussi un déplacement, ce qui expliquerait l'inactivité de l'enzyme lorsque la boucle est "ouverte".

I.2.5.3 Le site de fixation du coenzyme (Holbrook *et al.*, 1975)

Le site de fixation du coenzyme dans le complexe ternaire est représenté à la figure 9. Le coenzyme est sous une conformation ouverte, les différents groupements (figure 10) étant stabilisés par un certain nombre de résidus :

- Le groupement adénine se situe dans une poche hydrophobe. Un pont hydrogène (pont H) le lie à la tyrosine 85. Cette interaction joue vraisemblablement un rôle important dans le stade initial de la liaison du coenzyme.

- La position du ribose du groupe adénine dépend de la formation de deux ponts H entre ses hydroxyles et les aspartates 53 et 30 et la lysine 58.

- Une charge négative du pyrophosphate est stabilisée par un pont H avec l'arginine 140. L'autre charge négative forme probablement un pont H avec le solvant.

- Le cycle nicotinamide interagit avec des résidus hydrophobes, valines 32 et 247, et par un pont H avec la lysine 250. Ces différentes interactions sont responsables du fait que le cycle nicotinamide se présente toujours du même côté du site actif.

Tous les résidus impliqués dans la poche de fixation du coenzyme sont extrêmement conservés dans les différentes LDH.

McPherson (1970) propose le mécanisme d'association suivant : le cycle nicotinamide ne pourrait se lier par lui-même à l'apoenzyme. L'adénine, par contre, se fixerait d'abord et induirait un changement conformationnel permettant l'interaction avec le nicotinamide.

I.2.5.4 Le site actif

Dans le complexe ternaire, le pyruvate se situe clairement entre le nicotinamide du coenzyme et l'histidine 195 (Holbrook *et al.*, 1975). Un ion sulfate occupe la même place dans l'apoenzyme. La fermeture du site par la boucle dans le complexe ternaire empêche toute molécule de solvant d'y entrer. De plus, plusieurs résidus y sont déplacés, principalement l'arginine 109 et l'histidine 195; ce qui rend l'enzyme active et favorise, en outre, la reconnaissance des différents substrats qui lui sont proposés (Clarke *et al.*, 1989).

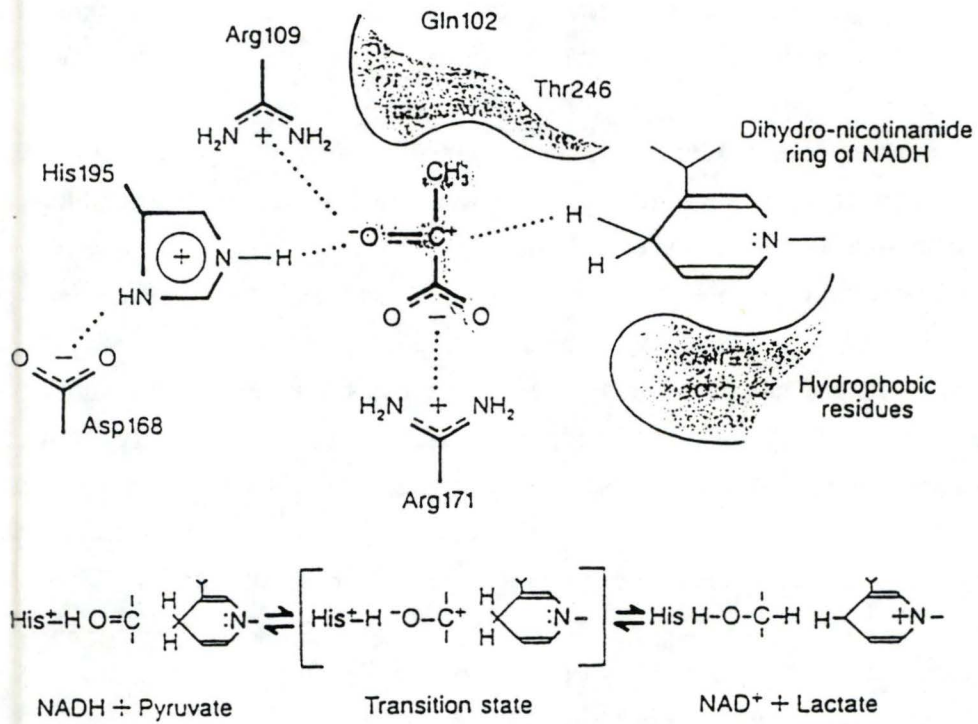


Figure 11

Représentation du site actif de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*. (Clarke *et al.*, 1989)

Une représentation du site actif se trouve à la figure 11. Les résidus cités prennent tous une part importante dans le mécanisme réactionnel. Ils sont très conservés dans les différentes lactate déshydrogénases. Voici, résumée, la contribution de chacun (Clarke *et al.*, 1989) :

- Le groupement amide de l'arginine 171, maintient le carboxyle du pyruvate à l'aide de deux ponts H. Le substrat, correctement orienté, peut être alors transformé par l'enzyme.

- L'histidine 195 forme un pont H avec l'oxygène du carbonyle du pyruvate. Cette interaction provoque une délocalisation des électrons qui permet l'attaque nucléophile, c'est-à-dire un transfert d'ion hydrure (H^-) du noyau nicotinamide du coenzyme sur le carbone du carbonyle. Finalement le proton, impliqué dans le pont H, est transféré à l'oxygène par l'histidine.

L'histidine 195 bouge de 2 Å lors de la fermeture de la boucle; ce qui est nécessaire au bon déroulement de la réaction (White *et al.*, 1976).

- L'aspartate 168 interagit avec l'histidine 195 et assure à l'aide d'un pont H la stabilité de sa forme protonée.

- L'arginine 109 est un résidu de la boucle impliquée dans le changement structural. L'arginine subit un déplacement d'environ 8 Å lors du passage de l'état conformationnel de l'apoenzyme vers celui de la structure ternaire (White *et al.*, 1976). Elle polarise également la liaison carbonyle du pyruvate et est impliquée dans la stabilisation de l'état intermédiaire de la réaction.

A côté de ces résidus extrêmement conservés, la poche de résidus qui entoure le méthyl du pyruvate, variable suivant les espèces, est probablement responsable de la discrimination plus ou moins importante entre plusieurs substrats. Elle est constituée des résidus 102, 240 et 246 (Clarke *et al.*, 1989).

La charge globale du site actif (à la fois le substrat, le coenzyme et les résidus) semble jouer un rôle important dans le déroulement correct de la réaction (Clarke *et al.*, 1989).

En résumé, la réaction se réalise de la manière suivante: le pyruvate est maintenu par l'intermédiaire de ponts H formés entre les atomes d'oxygène de son groupement carboxyle et les atomes d'hydrogène des groupements amines de l'arginine 171. L'histidine 195 forme un pont H avec l'oxygène du carbonyle du pyruvate, ce qui a pour effet de délocaliser les électrons et de permettre l'attaque par le noyau nicotinamide du coenzyme qui transfère un ion hydrure sur le carbone du carbonyle, pendant que

STEREOSPECIFICITY OF NAD⁺/NADH
DEPENDENT DEHYDROGENASES

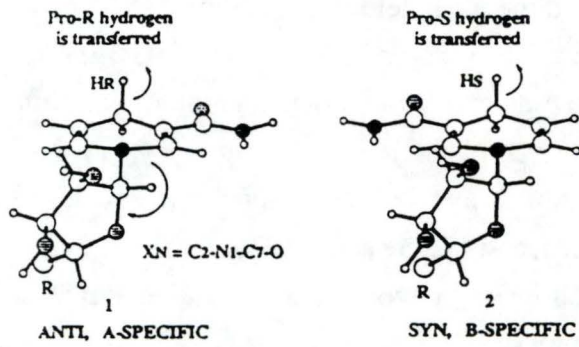


Figure 12

Stéréospécificité du coenzyme dans les déshydrogénases NAD⁺/NADH dépendantes (Wu et Houk, 1991).

l'histidine transfère un proton vers l'oxygène. L'arginine 109 et l'acide aspartique 168 participent également à cette délocalisation.

La position du substrat et du noyau nicotinamide du coenzyme semble bien fixée par les résidus du site actif. Il est donc probable que l'attaque nucléophile se produit toujours du même côté du substrat à l'aide du même ion hydrure. Cette régularité expliquerait la stéréospécificité de la lactate déshydrogénase.

I.2.6 La D-lactate déshydrogénase

Seuls certains procaryotes et eucaryotes inférieurs possèdent une D-LDH. Aucune de ces enzymes n'a été cristallographiée. L'absence de structure tridimensionnelle empêche toute comparaison précise avec les L-LDH. Pourtant, l'alignement des séquences connues de D-LDH procaryotes et de L-LDH permet de croire que ces deux enzymes ne sont pas homologues (Le Bras et Garel, 1991). Leur similitude réactionnelle ne serait qu'une convergence évolutive.

La D-LDH de *Leuconostoc mesenteroides* peut utiliser d'autres substrats, mais elle possède une spécificité beaucoup moins large que la L-LDH de muscle de lapin, sa capacité d'accepter d'autres substrats étant plus faible (Simon *et al.*, 1989).

I.2.7 Stéréospécificité de la LDH

La stéréospécificité de la lactate déshydrogénase est double. En effet, d'une part l'enzyme est stéréospécifique dans le sens où c'est toujours le même hydrogène du noyau nicotinamide qui est transféré vers le substrat. D'autre part le pyruvate, invariablement positionné de la même manière vis à vis du coenzyme, est toujours transformé en un seul des stéréoisomères du lactate.

I.2.7.1 Stéréospécificité du coenzyme

Comme le montre la figure 12, deux hydrogènes du coenzyme peuvent être utilisés dans l'attaque nucléophile (Wu et Houk, 1991). D'après les structures cristallographiques de L-LDH disponibles, le mécanisme réactionnel utilise toujours l'hydrogène "Pro-R" du nicotinamide. En fait le transfert de l'autre hydrure, le "Pro-S", est défavorisé par une énergie de transition de 10 Kcal./mol. plus élevée que celle de son concurrent (Lareau et Anderson, 1989). Cette différence d'énergie serait à la base de la stéréospécificité du coenzyme.

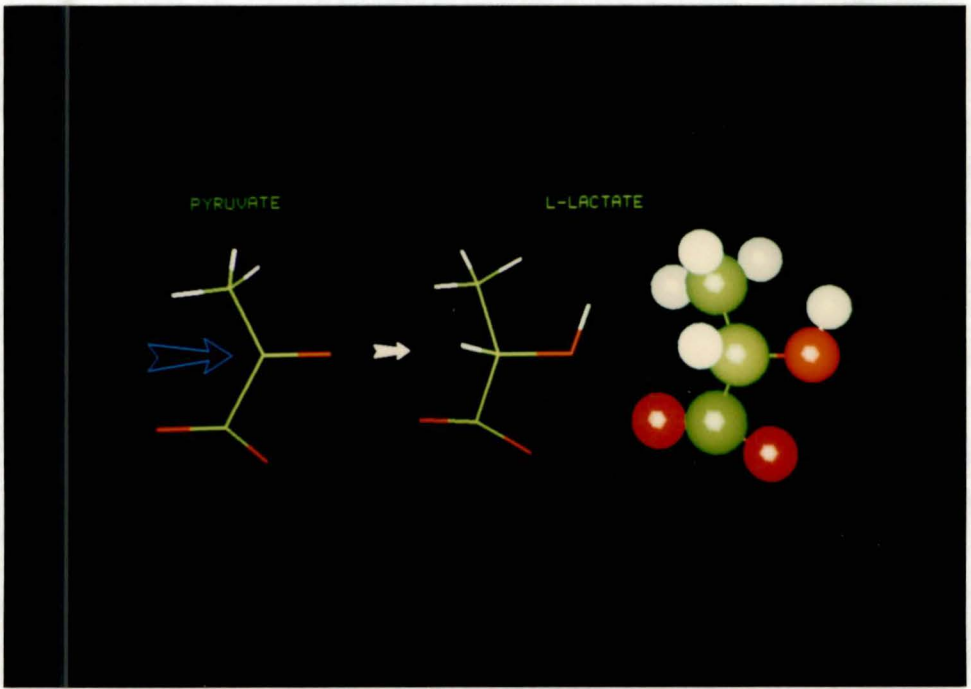


Figure 13

Production de L-lactate par la L-LDH de muscle de lapin. L'attaque nucléophile du pyruvate par le NADH se réalise perpendiculairement au plan de la photo.

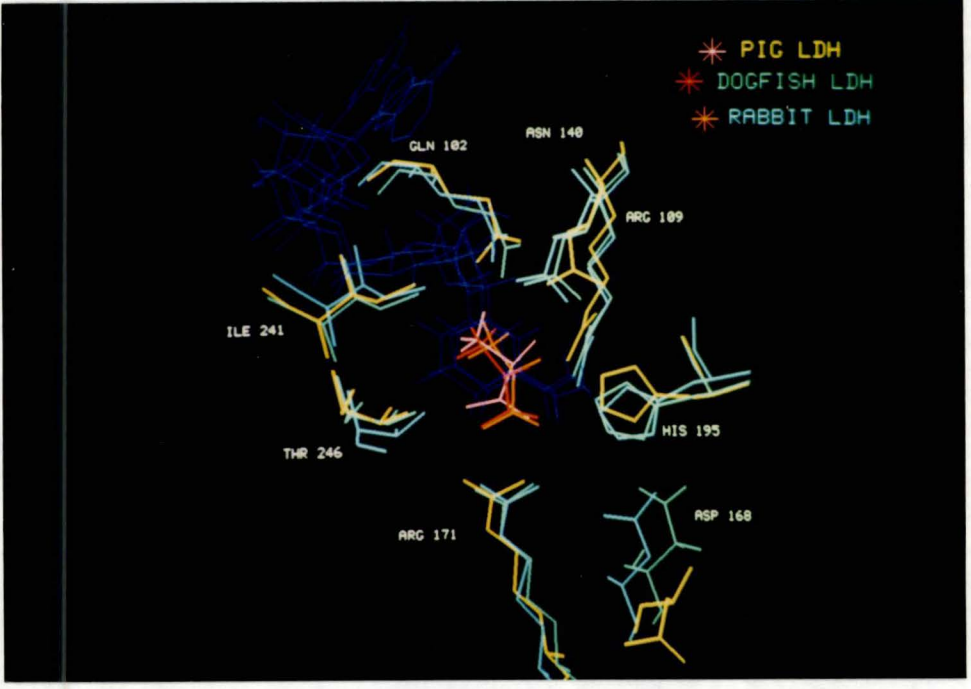


Figure 14

Comparaison du site actif de L-LDH de muscle de lapin (modèle), de muscle de roussette (structure cristallographique) et de muscle de porc (structure cristallographique).

Le même ion hydrure semble être employé par les D-LDH (Glasfeld *et al.*, 1990).

I.2.7.2 Stéréospécificité du produit

La stéréospécificité des L-LDH s'explique probablement de la manière suivante. D'un côté l'attaque nucléophile se réalise toujours de la même manière. De l'autre, le pyruvate est fixé au niveau du site actif dans une position bien précise par les résidus 109, 171 et 195. Comme le montre la figure 13, le produit obtenu ne peut être que du L-lactate (Holbrook *et al.*, 1975).

Cette énantiospécificité se retrouve également lorsque l'on utilise d'autres substrats (Kim et Whitesides, 1988). La L-LDH est donc une enzyme très utile pour la production stéréospécifique d' α -hydroxy acides (Wilks *et al.*, 1990).

I.2.8 L-Lactate déshydrogénase de muscle de lapin

La L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin, de type M4 (4 monomères de type "Muscle"), possède un poids moléculaire de 140.000 Daltons. La séquence du monomère, d'une longueur de 331 acides aminés, a été déterminée par Sass en 1989. Le pourcentage de similarité entre cette séquence et celles d'autres organismes supérieurs (homme, rat, souris, poulet, porc, roussette) se situe entre 75 et 95 %. La structure de cette LDH est inconnue.

Un modèle de cette structure a été réalisé à partir de la structure cristallographique du complexe ternaire de la LDH de muscle de roussette (Vinals, non publié). Le pourcentage d'identité entre les deux séquences est de 75 %. Le degré de similarité est proche de 90 %. Ce pourcentage élevé permet de supposer que les deux structures tridimensionnelles sont proches l'une de l'autre.

Le mécanisme catalytique, l'association en tétramère ainsi que les différents domaines sont identiques à ceux de la LDH de muscle de roussette.

Le modèle obtenu a été comparé avec la structure cristallographique de la LDH de muscle de porc (Holbrook, non publié). Cette enzyme possède une séquence de 331 acides aminés quasiment identique à celle de lapin (94 % d'identités). La distance moyenne (le "root mean square" ou RMS) entre les squelettes des deux molécules est de 1,98 Å; celle du site actif est de 0,78 Å (figure 14).

Le RMS est calculé comme suit:

$$\text{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{aw} (x_{i1}-x_{i2})^2 + (y_{i1}-y_{i2})^2 + (z_{i1}-z_{i2})^2}{aw}}$$

où a est le nombre d'atomes considérés par résidu, w le nombre de résidus dans chaque structure. x_{ij} , y_{ij} , z_{ij} sont les coordonnées cartésiennes de l'atome i de la structure j .

Lorsque le RMS entre deux petits segments de structures se situe en dessous de 1 Å, les structures sont considérées comme identiques.

I.2.9 Mutations réalisées sur la LDH

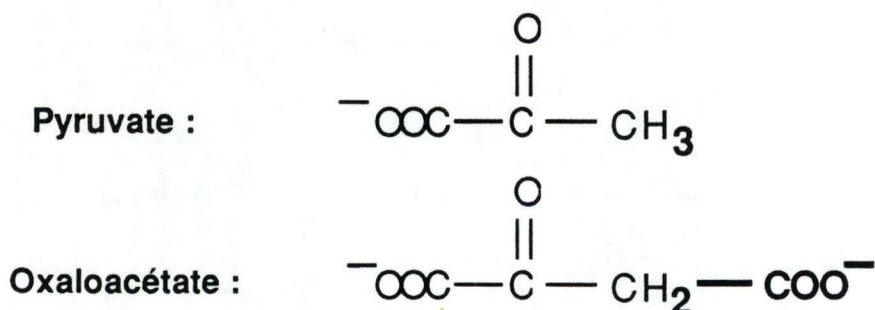
Une enzyme peut être utilisée pour la synthèse de composés simples tels que des herbicides et des médicaments. Depuis la tragédie du Softénon (un médicament contre les nausées matinales, qui contenait un mélange de deux énantiomères dont l'un est responsable de malformations foetales), les médicaments à utilisation humaine sont composés d'un seul stéréoisomère (Dunn *et al.*, 1991).

Or, la LDH native produit 100 % d'énantiomères. Malheureusement, seuls les petits substrats correctement chargés peuvent être transformés par la L-LDH. Le site actif, très sensible à la taille et à la charge du substrat, est donc d'une utilité limitée dans la synthèse stéréospécifique de médicaments constitués en général de longues chaînes (Dunn *et al.*, 1991).

Une série de modifications ont été apportées à la lactate déshydrogénase en vue de transformer ses propriétés catalytiques, principalement afin d'élargir sa spécificité envers d'autres substrats.

I.2.9.1 L-LDH mutante spécifique de l'oxaloacétate

Une série de modifications ont été réalisées afin de produire une L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* mutante adaptée à l'emploi d'un nouveau substrat : l'oxaloacétate.



Pour caractériser l'activité d'une enzyme, les valeurs suivantes peuvent être utilisées :

- Le **K_{cat}** est la vitesse réactionnelle maximale (V_{max}) de catalyse par mole de site catalytique. Plus la vitesse est élevée, plus le K_{cat} est important.
- Le **K_m**, la constante de Michaelis, est caractéristique de chaque substrat. Il est défini comme étant la concentration du substrat pour laquelle une enzyme fonctionne à une vitesse égale à la moitié de sa vitesse maximale. De cette manière, il représente l'affinité de l'enzyme pour un substrat. Plus le K_m est faible, plus l'affinité est élevée.
- Le rapport **K_{cat}/K_m** mesure l'efficacité catalytique de l'enzyme envers un substrat. Plus ce rapport est élevé, plus l'efficacité est importante, c'est-à-dire plus la vitesse et l'affinité sont grandes.
- Le rapport du K_{cat}/K_m de l'oxaloacétate sur le K_{cat}/K_m du pyruvate représente le rapport d'efficacité entre les deux substrats. Ce rapport peut être utilisé pour évaluer la spécificité relative d'une enzyme envers ces deux substrats. Dès lors, il peut nous renseigner sur le déplacement de spécificité provoqué par des mutations.
Ce rapport vaut $0,95 \cdot 10^{-3}$ pour l'enzyme native (Dunn *et al.*, 1991).

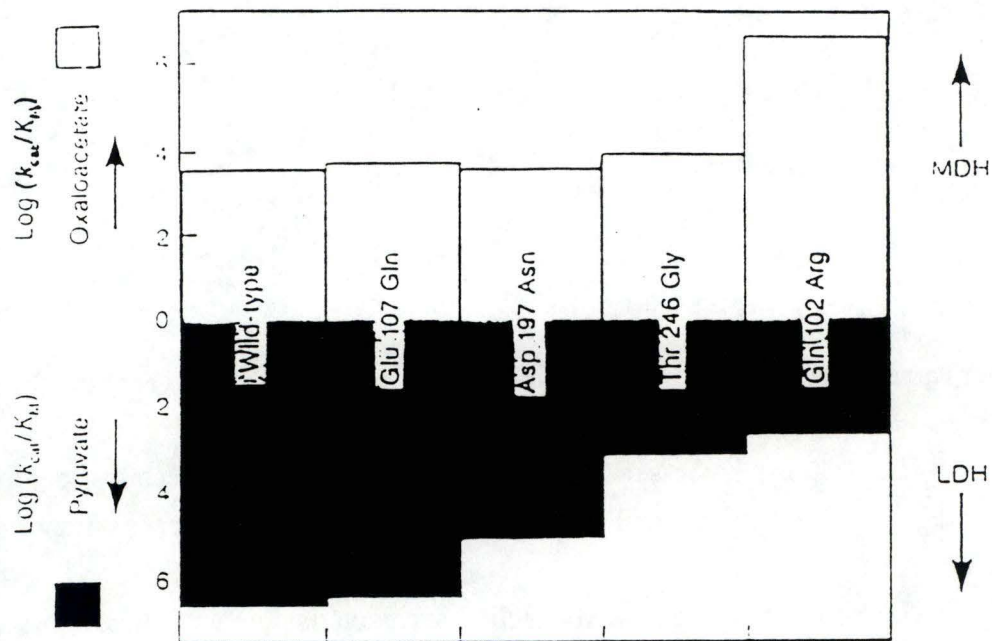


Figure 15

Sélection du substrat par des L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* mutantes et native. L'efficacité des différentes enzymes pour le pyruvate et l'oxaloacétate est représentée par le logarithme du k_{cat}/K_M (Clarke *et al.*, 1989).

a) Le glutamate 107 se situe à une dizaine d'Å du substrat et s'expose entièrement au solvant. Il a été muté en glutamine en vue de confirmer l'importance de la charge globale de la région du site actif (Clarke *et al.*, 1989), la seule différence entre les deux résidus étant l'absence d'une charge négative sur la glutamine.

Le déplacement de la spécificité vers l'oxaloacétate est égal à deux (c'est-à-dire le rapport entre l'efficacité de l'oxaloacétate et l'efficacité du pyruvate est multiplié par deux par rapport à l'enzyme native). Ce résultat semble logique car le résidu est en contact direct avec le solvant polaire; ce qui en diminue les effets électrostatiques (figure 15).

b) L'aspartate 197 se trouve également à une dizaine d'Å du substrat. Mais à la différence du résidu 107, il se situe à l'intérieur de la protéine. Afin de montrer l'importance de la charge globale de la région du site actif, il a été remplacé par une asparagine.

L'enzyme mutante a un rapport du K_{cat}/K_m de l'oxaloacétate sur celui du pyruvate multiplié par 25 par rapport à l'enzyme native (Clarke *et al.*, 1989). Une nette amélioration est ainsi apportée au résultat obtenu avec le résidu 107 (figure 15). Néanmoins, le K_{cat}/K_m de l'oxaloacétate reste inférieur à celui du pyruvate.

c) La thréonine 246 est en contact direct avec le pyruvate. Elle fait partie de la poche de reconnaissance du substrat. Son remplacement par une glycine entraîne une augmentation de l'espace disponible au sein du site actif.

L'enzyme mutante obtenue a une spécificité déplacée vers l'oxaloacétate d'un facteur 3000 par rapport à l'enzyme native (Clarke *et al.*, 1989).

En fait, les changements de spécificité provoqués par les mutations des résidus 107, 197 et 246, sont essentiellement causés par la réduction de l'efficacité de la LDH vis-à-vis du pyruvate (Clarke *et al.*, 1989).

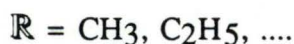
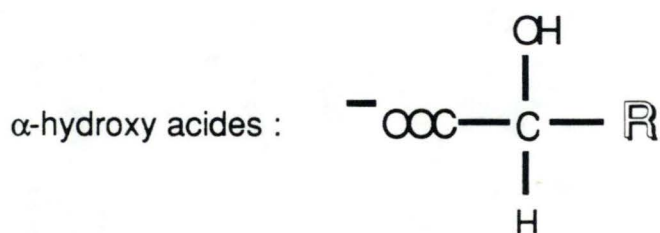
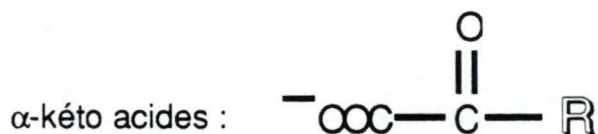
d) La glutamine 102 interagit avec le méthyle du pyruvate. Clarke *et al.* (1989) ont remplacé ce résidu par une arginine. Le rapport entre l'efficacité de l'enzyme mutée envers l'oxaloacétate et celle envers le pyruvate est de $8,4 \cdot 10^3$ (figure 15). Ce qui correspond à un déplacement de la spécificité vers l'oxaloacétate d'un rapport égal à 10^7 .

L'arginine, dont l'encombrement stérique est plus important que la glutamine, apporte une charge positive supplémentaire. Or, en présence d'oxaloacétate, molécule plus grande que le substrat habituel, une charge négative est ajoutée.

La conservation de la charge globale semble donc plus importante que l'encombrement stérique dans le choix du substrat. La glutamine 102 paraît jouer un rôle très important dans l'affinité envers le substrat (Clarke *et al.*, 1989).

I.2.9.2 L-LDH de *B.stearotermophilus*. mutante spécifique d' α -cétoacides à longue chaîne aliphatique (Wilks *et al.*, 1990)

La formule générale des α -cétoacides et de leur forme réduite, les α -hydroxy acides, est la suivante :



Deux régions bordant le site actif, mais qui ne sont pas impliquées dans la réaction catalytique, ont été altérées afin de permettre à l'enzyme de transformer des substrats contenant une longue chaîne hydrophobe. La première région, composée des résidus Q102, K103 et P105, fait partie de la boucle qui se replie sur le coenzyme. La seconde, composée des résidus A235 et A236, est localisée sur l'hélice G sur laquelle la boucle se referme. Selon Wilks, l'espace entre ces deux régions formerait la "mâchoire" à l'intérieur de laquelle la reconnaissance de la chaîne principale du substrat a lieu.

Les mutations réalisées sont les suivantes :

1) Q102M, K103V, P105S.

L'introduction de la méthionine et de la valine, à la place de la glutamine et de la lysine, augmente l'hydrophobicité de la région. De cette manière, les substrats avec une longue chaîne aliphatique peuvent se lier à l'enzyme plus facilement.

Le remplacement de la proline par une sérine rend la boucle plus flexible et permet l'accès au site actif de substrats plus larges.

2) A235G, A236G.

Les mutations de deux alanines en glycines provoquent la cassure de l'hélice G (voir structures secondaires de la L-LDH de muscle de roussette, chapitre I.2.5.1). Cette altération permet la liaison de larges substrats. Notons que la L-LDH de testicules de souris, qui accepte de plus grands substrats, contient deux alanines à cet endroit.

Les L-LDH mutantes pour une seule des deux régions augmentent légèrement leur affinité pour les substrats possédant une grande chaîne principale (K_{cat}/K_m légèrement plus élevé).

Lorsque les cinq mutations sont réalisées simultanément, les auteurs obtiennent une véritable α -hydroxy acide déshydrogénase spécifique des substrats à longues chaînes aliphatiques. Par exemple, le K_{cat} de la L-LDH mutante pour l' α -cétoisocaproate [$R=(CH_3)_2CHCH_2$] est 55 fois plus élevé que celui de la L-LDH native.

Ces constatations suggèrent que la production de deux "jeux" de mutations est nécessaire à la fabrication d'une enzyme spécifique de plus grands α -cétoacides.

I.2.9.3 Autres mutations de la LDH

a) L'arginine 109 se trouve dans la boucle qui se rabat lorsque le coenzyme et le substrat sont dans le site actif (Clarke *et al.*, 1986). Ce résidu est très conservé dans les L-LDH. Il polarise le carbonyle du pyruvate et ensuite stabilise l'état intermédiaire de la réaction. Chez *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearo.*), il a été remplacé par une glutamine dont l'hydrophilicité est semblable mais qui ne contient pas de charge (Clarke *et al.*, 1986). L'étape limitante, qui était le réarrangement du complexe ternaire dans l'enzyme native, devient la transfert de l'ion hydrure.

Le rôle de l'arginine est de diminuer la barrière énergétique d'activation de ce transfert. L'énergie nécessaire à ce transfert est 4,2 Kcalories plus faible avec l'arginine qu'avec la glutamine.

b) L'asparate 168, proche de l'histidine 195, joue un rôle dans la polarisation de l'imidazole de ce résidu dans le complexe ternaire (Clarke *et al.*, 1988). Il a été remplacé par une alanine ou une asparagine.

L'analyse des deux enzymes mutantes montre que les deux substitutions provoquent une réduction de l'affinité pour le pyruvate mais pas pour le lactate (Clarke *et al.*, 1989). Cette différence résulte du fait que l'histidine doit être protonée dans le complexe ternaire LDH-pyruvate-NADH, alors qu'elle est non protonée dans le complexe LDH-lactate-NAD⁺.

La charge négative de l'aspartate complémente la charge positive du groupe imidazole. Elle réduit de cette manière l'énergie libre et donc facilite l'interaction entre l'histidine et le pyruvate (Clarke *et al.*, 1989).

c) L'arginine 171 forme deux ponts H avec le carboxyle du pyruvate. Afin de maintenir la même charge et un encombrement stérique identique, mais réduire cette interaction de moitié, elle a été remplacée par une lysine chez *B. stearo.* (Hart *et al.*, 1987 A et B).

Les effets sur la fixation du substrat sont très importants. L'affinité de l'enzyme pour le pyruvate chute à 0,05 % de celle de la protéine native. Deux facteurs contribuent à ce phénomène (Clarke *et al.*, 1989) :

Premièrement, l'interaction par ponts H entre l'arginine et le pyruvate est double, alors qu'elle est simple pour la lysine. Le double pont H joue un rôle important dans la sélection des substrats car il force l'orientation de ce dernier. Ainsi les résidus formant la poche de reconnaissance peuvent mieux distinguer et sélectionner les différents substrats. De plus, le potentiel d'hydratation du résidu natif est deux fois supérieur à celui de son remplaçant. Ce potentiel plus élevé entraîne une augmentation de l'entropie, favorable à la réaction.

d) L'arginine 173 fait partie du site régulateur du FBP chez *B. stearo.* qui est responsable de la tétramérisation de l'enzyme. Elle est extrêmement conservée dans les LDH. Elle semble avoir un rôle analogue dans le site de fixation d'anion chez les LDH eucaryotiques.

L'arginine a été remplacée par une glutamine (Clarke *et al.*, 1987). La mutation n'a pas d'effet sur les propriétés catalytiques toujours aussi faibles du dimère. Par contre, le tétramère mutant est 400 fois plus stable que le natif. De plus, il est plutôt déstabilisé par le FBP.

Ce résidu semble donc directement impliqué dans la fixation du fructose-1,6-biphosphate. Il régule en partie l'état de la structure quaternaire par un mécanisme de répulsion de charges.

e) L'isoleucine 250 forme une poche hydrophobe près du noyau nicotinamide chez *B. stearo.* Elle représente la moitié de la surface accessible de la poche du nicotinamide dans l'apoenzyme.

Afin de rendre la protéine plus stable thermiquement, une diminution des régions hydrophobes en contact direct avec le solvant est réalisée en remplaçant l'isoleucine par un résidu hydrophile, une asparagine (Wigley *et al.*, 1987).

L'enzyme mutante possède une affinité plus faible pour le pyruvate et pour le NADH. De plus le mécanisme enzymatique, habituellement ordonné BiBi, devient aléatoire BiBi. Enfin, la stabilité thermique de la protéine augmente.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce dernier phénomène :

- la diminution de la région hydrophobe accessible au solvant.
- la formation d'un pont hydrogène entre les résidus 250 et 246.

I.2.9.4 Conclusions

Ces travaux montrent l'importance de tous les résidus du site actif dans le déroulement du mécanisme réactionnel. Ils possèdent tous une fonction bien précise qui permet à l'enzyme d'utiliser un substrat, le pyruvate, et de fournir un produit, le L-lactate.

Le remplacement d'un des résidus peut entraîner des modifications importantes.

D'autre part, les techniques génétiques de transformation d'une protéine *in vitro* nécessitent un temps considérable.

C'est pourquoi il peut être intéressant de systématiser et réfléchir tout changement, en vue de transformer les propriétés de l'enzyme, avant de passer à la pratique.

Le chapitre suivant expose les principes de la modélisation de structures tridimensionnelles qui pourront être utilisés pour la sélection des mutations produisant les effets recherchés.

I.3 La modélisation de structures tridimensionnelles

I.3.1 Energie libre d'une protéine

Dès sa synthèse dans le ribosome, la chaîne polypeptidique se replie et prend sa forme globulaire native. La spontanéité de ce processus, appelé "folding", a été mise en évidence par des expériences de dénaturation-renaturation (Anfinsen, 1973).

Le caractère spontané s'explique par le fait que l'enzyme passe d'un état déplié (d) à énergie libre élevée, vers l'état natif (n) à énergie libre plus faible (Schultz et Schirmer, 1985 : chapitre 8). L'explication de ce phénomène reste très complexe. Nous pouvons le résumer de cette manière:

L'équation suivante exprime l'énergie libre (G) en fonction de l'enthalpie (H) et de l'entropie (S) :

$$G = H - TS \quad (\text{Equation I.3.1.1})$$

où T est la température en degrés Kelvin.

L'enthalpie d'une protéine représente la somme de toutes ses énergies de liaison. Quant à l'entropie, elle mesure le niveau du désordre dans lequel elle se situe. Selon la seconde loi de la thermodynamique, une réaction est spontanée lorsque la différence d'énergie libre (ΔG) est négative :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equation I.3.1.2})$$

où $\Delta G = G_n - G_d$, c'est-à-dire la différence d'énergie libre entre l'état natif et déplié

$\Delta H = H_n - H_d$, la différence d'enthalpie entre l'état natif et déplié.

et $\Delta S = S_n - S_d$, la différence d'entropie entre l'état natif et déplié.

Si nous appliquons cette équation à une protéine dans le solvant, nous obtenons:

$$\begin{aligned} \Delta G \text{ totale} &= \Delta H \text{ prot.} - T\Delta S \text{ prot.} \\ &+ \Delta H \text{ solvant} - T\Delta S \text{ solvant} \end{aligned} \quad (\text{Equation I.3.1.3})$$

La différence d'enthalpie ΔH prot., comprenant les interactions au sein de la protéine ainsi que celles entre la molécule et le solvant, est globalement positive. En effet, les résidus hydrophiles, enfouis dans la protéine à l'état natif, sont incapables de créer des interactions, présentes à l'état déplié, avec le solvant. Vu que l'état déplié est beaucoup plus désordonné que l'état natif, le ΔS prot. est largement négatif. Ces deux composantes tendent donc à défavoriser la forme native (ΔG Prot. > 0).

La séparation entre les résidus hydrophobes et l'eau, lors du repliement de la molécule, provoque une augmentation de l'entropie du solvant (ΔS solvant). De plus, la réorganisation de l'eau autour de la protéine native, diminue son enthalpie (ΔH solvant).

Ces deux éléments favorisent la forme native à un point tel que le ΔG total est légèrement négatif et est donc responsable du repliement spontané du polypeptide.

Epstein *et al.* (1963) supposent que la structure native de la protéine se situe dans un minimum global d'énergie libre.

Par contre, Wetlaufer et Ristow (1973) prétendent que la structure native correspond à un minimum local. Selon eux, les barrières d'énergie que le polypeptide doit franchir pour atteindre le minimum global sont trop élevées. Aucune preuve expérimentale n'a pu démontrer l'exactitude de l'une ou l'autre de ces hypothèses.

1.3.2 Energie libre et énergie potentielle

L'énergie libre d'une protéine est une fonction de son énergie potentielle. La différence d'énergie libre ($G_j - G_i$), entre deux états conformationnels différents i et j , est proportionnelle à la différence d'énergie potentielle ($E_{pj} - E_{pi}$):

$$G_j - G_i = -k_b T \ln (\exp [-(E_{pj} - E_{pi})/k_b T])^\lambda \quad (\text{équation I.3.2.1})$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T la température. λ représente la totalité des variables géométriques expliquées au chapitre I.3.3 (van Gunsteren et Weiner, 1989).

Par conséquent l'énergie potentielle reflète la conformation dans laquelle se trouve la molécule. Son utilisation permet la simulation du repliement. Malheureusement, les fonctions quantiques qui permettent de calculer cette énergie potentielle deviennent inutilisables pour des molécules contenant plusieurs milliers d'atomes (Mc Cammon et Harvey, 1988).

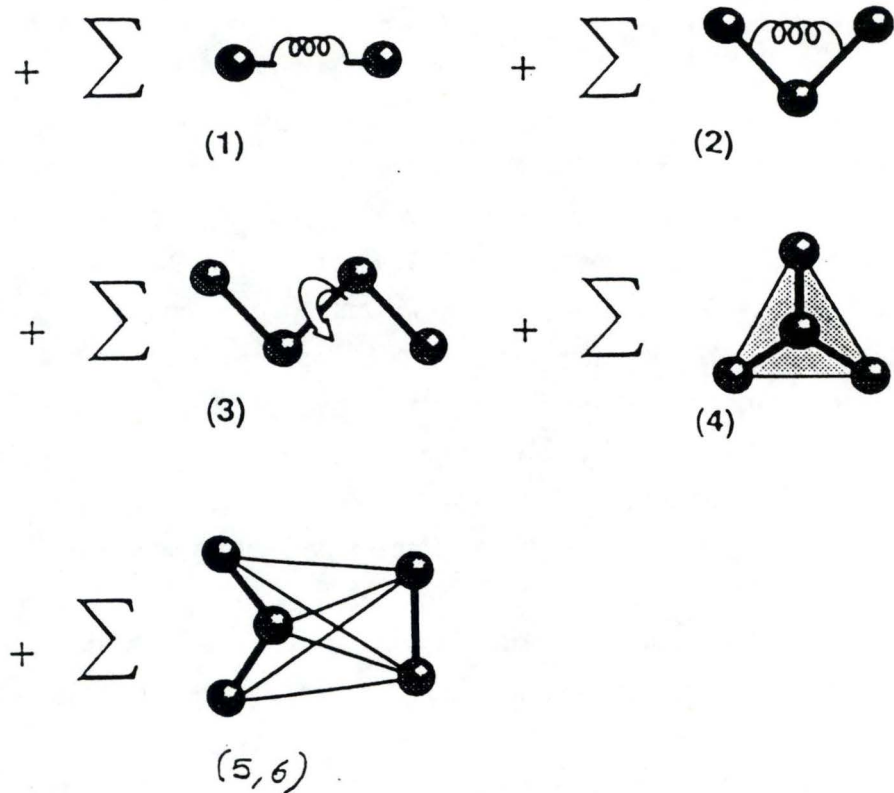


Figure 16

Représentation schématique des différents éléments du Force Field (Discover,1991).

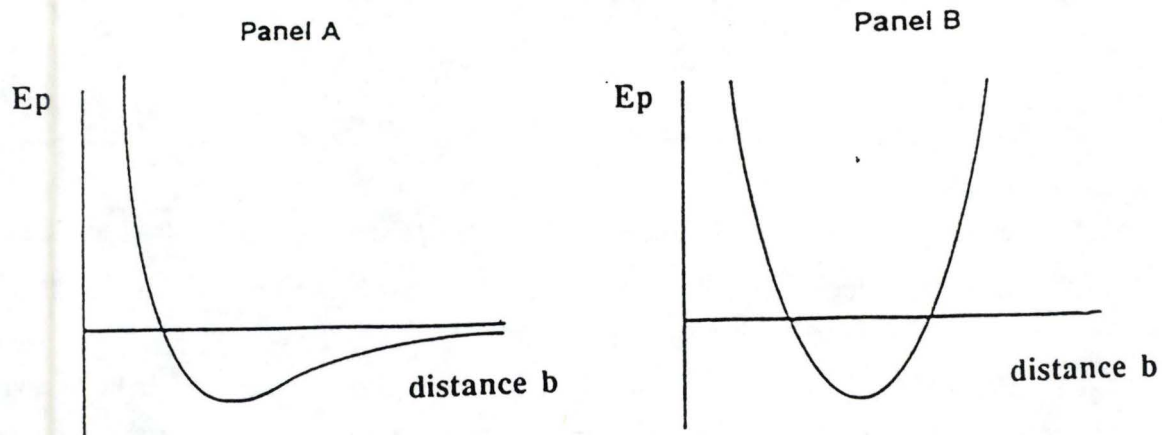


Figure 17

Fonction Morse (A) et fonction harmonique (B) de l'énergie (E_p) d'une liaison C-H en fonction de la distance qui sépare les deux atomes (b). Notons que la fonction Morse accepte des distances très élevées (Discover,1991).

Pour franchir cet obstacle, des fonctions empiriques, adaptées au calcul de l'énergie potentielle des protéines, sont développées depuis quelques années. Ces fonctions, ainsi que leurs paramètres, sont réunis sous le terme de "**Force Field**" (Mc Cammon et Harvey, 1988). Elles doivent tenir compte de toutes les interactions présentes au sein d'une molécule.

I.3.3 Le Force Field

Chaque terme, représenté à la figure 16, décrit une interaction, une variable géométrique, bien précise.

(1) L'énergie potentielle d'un lien covalent entre deux atomes en fonction de la distance les séparant peut être exprimée par la fonction "morse" ou par la fonction harmonique:

a) la fonction Morse:

$$E_{p_{\text{morse}}} = \sum D_b [1 - e^{-(b-b_0)^2}]$$

b_0 , le rayon covalent, correspond à la distance d'équilibre à laquelle l'énergie est minimale. D_b est une constante caractéristique des atomes.

Cette fonction accepte des distances élevées, inimaginables dans la réalité. Elle s'utilise en début de modélisation lorsque des délétions séparent exagérément des atomes liés (figure 17).

b) Par la suite, elle est remplacée par la fonction harmonique, plus proche de la réalité mais qui ne permet pas d'éloignement atomique (figure 17) :

$$E_{p_{\text{harmonique}}} = \frac{1}{2} \sum K_b (b - b_0)^2$$

K_b est une constante dépendant des atomes mis en jeu.

(2) L'angle de valence (θ) correspond à l'angle formé par deux liaisons covalentes successives (figure 16). L'énergie potentielle d'un angle de valence se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$E_{P_{\text{valence}}} = \frac{1}{2} \sum H_{\theta}(\theta - \theta_0)$$

H_{θ} est analogue à K_b . On atteint le minimum d'énergie lorsque l'angle vaut θ_0 .

(3) L'angle de torsion (ϕ) est l'angle formé par trois liaisons covalentes successives (figure 16). Son énergie est décrite sous forme d'une fonction périodique:

$$E_{P_{\text{torsion}}} = \frac{1}{2} \sum H_{\phi} [1 + \cos(n\phi)]$$

H_{ϕ} est analogue à H_{θ} .

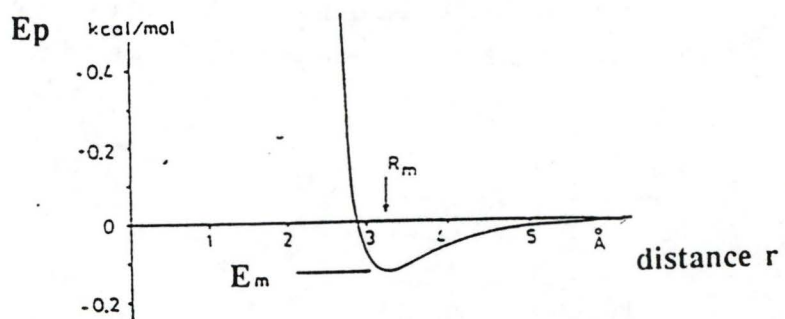
Chaque structure secondaire est caractérisée par des angles de torsions du squelette bien précis.

(4) L'angle "out of plane" (χ) caractérise trois liaisons covalentes liant quatre atomes dont l'un se trouve en dehors du plan formé par les trois autres (figure 16). Il correspond à l'angle qui se situe entre ce plan et la liaison covalente qui relie un des atomes du plan à celui qui se trouve en dehors. Son énergie se calcule comme suit :

$$E_{P_{\text{out-of-plane}}} = \frac{1}{2} \sum H_{\chi} \chi^2$$

où H_{χ} est analogue à H_{ϕ} .

(5) Les interactions de Van Der Waals (VDW) interviennent entre atomes globalement neutres, non liés, dans lesquels apparaissent des dipôles momentanés. Ces atomes subissent d'un coté une attraction due à leur dipôle, de l'autre une répulsion due à la proximité de leurs couches électroniques.



Lennard-Jones 6-12 potential for dispersion forces and electron repulsion ($R_m = 3.24 \text{ \AA}$, $E_m = -0.13 \text{ kcal/mol}$)

Figure 18

Variation de l'énergie de VDW en fonction de la distance interatomique. Le rayon de VDW (R_m) est la distance entre deux atomes non liés au niveau de laquelle l'énergie est minimale. En deçà de cette limite, l'énergie augmente rapidement. Ce qui provoque une répulsion des atomes. Au delà, l'énergie augmente lentement, tendant à les rapprocher. Elle atteint finalement zéro à plus grande distance (Schultz et Schirmer, 1985).

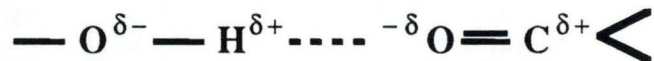
Ces interactions, associées à la fonction Lennard-Jones (figure 18), sont constituées de deux termes, l'un en r^{12} correspondant à une répulsion, l'autre en r^6 correspondant à une attraction.

$$E_{p_{VDW}} = \sum \left(\frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \right)$$

où A et B sont des constantes propres aux atomes mis en jeux; r est la distance entre les deux atomes.

La distance "r" correspondant au minimum de l'énergie potentielle et est appelée rayon de VDW.

Les ponts hydrogène sont inclus dans cette fonction. Ils représentent le partage d'un proton entre une base et un acide. Ils réunissent une charge partielle positive, le proton, et une négative, l'accepteur du proton à très courte distance; en voici un exemple :



En général, ces charges font partie de dipôles. Ce type d'interaction possède une énergie se situant entre celle de VDW et celle d'une liaison covalente.

(6) Finalement, les forces électrostatiques, c'est-à-dire l'interaction de deux atomes chargés et non liés, sont représentées sous la forme de l'équation de Coulomb (figure 16):

$$E_{p_{\text{électrostatique}}} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r}$$

où q_i et q_j sont les charges des atomes, ϵ la constante diélectrique et r la distance séparant les deux atomes.

La fonction énergie potentielle totale pour une protéine se calcule donc de la manière suivante :

$$\begin{aligned}
 E_{P_{\text{total}}} = & \frac{1}{2} \sum_{\text{harmonique}} K_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{valence}} H_\theta (\theta - \theta_0) \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{torsion}} H_\phi [1 + \cos(n\phi)] + \frac{1}{2} \sum_{\text{out-of-plane}} H_\chi \chi^2 \\
 & + \sum_{\text{VDW}} \left(\frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \right) + \sum_{\text{electrostatique}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r}
 \end{aligned}$$

Grâce à cette fonction empirique, et à l'aide d'ordinateurs très puissants, il devient possible de minimiser l'énergie potentielle d'une structure protéinique jusqu'à atteindre un minimum, pouvant correspondre éventuellement à la forme native de la protéine.

Le calcul nécessaire à l'obtention de ce minimum fait appel à de nombreux concepts mathématiques. Ces concepts aisément applicables à de petites molécules demandent un temps de calcul très important pour les protéines.

I.3.4 La minimisation d'énergie (Fasman, 1989: pp 317- 329)

La minimisation de l'énergie potentielle permet l'étude des changements de structure et d'activité, provoqués par le remplacement d'un ou plusieurs résidus dans un modèle protéique.

La conformation caractéristique du minimum d'énergie reflète sa structure native. Lorsqu'un remplacement de résidu est effectué dans le modèle, la protéine voit son énergie augmenter considérablement. Par exemple, une glycine est remplacée par une arginine au sein d'une enzyme. L'encombrement stérique dû à la taille plus élevée de l'arginine provoque l'augmentation de l'énergie potentielle.

Après chaque remplacement, il faut minimiser l'énergie de la protéine modifiée jusqu'à atteindre son nouveau minimum. La conformation correspondante est alors le reflet de la structure tridimensionnelle réelle de l'enzyme mutante.

Les changements conformationnels induits permettent ainsi la formulation d'hypothèses sur les modifications éventuelles d'activité.

I.3.4.1 Méthode de minimisation d'énergie

Lorsque la dérivée de la fonction énergie par rapport aux coordonnées atomiques est égale à zéro, la fonction est à un minimum. Le but de la minimisation d'énergie est donc de trouver les valeurs des coordonnées atomiques qui annulent la dérivée. Il est impossible, pour la fonction décrite ci-dessus, de déterminer analytiquement ces coordonnées atomiques, et l'utilisation de méthodes numériques devient dès lors indispensable.

Pratiquement, la minimisation consiste à ajuster la conformation de départ afin de diminuer son énergie. Le nombre d'ajustements ou **itérations**, nécessaires pour atteindre le minimum, dépend de la structure d'origine, de la taille de la molécule et surtout de la méthode utilisée.

Les deux algorithmes les plus employés pour la minimisation de l'énergie potentielle des protéines sont le "steepest descent" et le "conjugate gradient" (Fasman, 1989).

Il existe un inconvénient majeur aux techniques de minimisation d'énergie: elles ne permettent pas l'augmentation de l'énergie. La fonction énergie potentielle d'une protéine possède un nombre important de minima locaux dont aucun ne correspond à la conformation native. Chacun de ces minima est séparé des autres par des barrières énergétiques que la minimisation ne permet pas de franchir.

Or, un remplacement arbitraire apporté à un modèle peut transformer considérablement la fonction énergie. De ce fait, le minimum obtenu par simple minimisation après transformation ne correspond pas obligatoirement au minimum global. La conformation locale que l'on peut obtenir est alors caractéristique d'un état métastable différent de la conformation réelle de la protéine. Ce problème peut être parfois résolu grâce à l'emploi de la dynamique moléculaire.

I.3.5 La dynamique moléculaire (Discover, 1991):

Chaque atome d'une molécule présente un mouvement brownien, fonction de sa masse (m) et de la température. Ce mouvement brownien est caractérisé par la probabilité $P(v)$ que cet atome possède une vitesse v à une température T (Kane et Sternheim, 1986):

$$P(v) = \left(\frac{m}{2\pi k_b T} \right)^{3/2} e^{-mv^2/2k_b T} 4\pi v^2 \quad (\text{équation I.3.5.1})$$

où k_b est la constante de Maxwell-Boltzmann.

La vitesse la plus probable (V_p) que l'atome possède à une température T est :

$$V_p = \sqrt{\frac{2k_b T}{m}} \quad (\text{équation I.3.5.2})$$

La vitesse d'un atome est donc proportionnelle à la température du milieu. Puisque la vitesse caractérise l'énergie cinétique (E_c), cette énergie est directement proportionnelle à la température.

$$E_c = 1/2 mv^2 \text{ donc } E_c = 3/2 k_b T \quad (\text{équation I.3.5.3})$$

De plus, le même atome subit une force F égale à moins la dérivée de l'énergie potentielle (ΔEP) par rapport à sa position dans l'espace (Δr) :

$$F = m.a = - \Delta EP / \Delta r \quad (\text{équation I.3.5.4})$$

où a est l'accélération de l'atome

Pour rappel, la minimisation nous conduit vers un minimum de la fonction énergie potentielle. Ce minimum peut être global. Il reflète alors la structure native.

Mais il peut être aussi local. Si les remplacements de résidus ne sont pas importants, ce minimum est proche du minimum global. Si c'est le cas, cette proximité permettra à la dynamique moléculaire de l'atteindre sans difficulté par simulation à haute température.

En effet, cette dernière permet de franchir les barrières énergétiques séparant les différents minima ; la chaleur fournie, c'est-à-dire l'énergie cinétique, étant suffisante au saut de ces obstacles.

En fait, la somme de l'énergie cinétique, importante à haute température, et de l'énergie potentielle de la conformation de départ, est supérieure aux barrières énergétiques; ce qui permet leur franchissement :

$$E_t = E_p + E_c \quad (\text{équation I.3.5.5})$$

Pendant un temps donné très court, chaque atome va se déplacer dans la direction déterminée par la force qu'il subit (équation I.3.5.4). L'espace parcouru dans cette direction va dépendre de la vitesse initiale de l'atome (donc de la température), de sa masse et de son accélération. Après déplacement, l'énergie est recalculée ainsi qu'une nouvelle direction de déplacement.

Il est possible de travailler soit à température constante, soit à énergie totale constante :

- Lors d'une simulation, un grand nombre de conformations différentes sont générées. Toutes ces conformations correspondent à des énergies potentielles différentes. Si l'énergie totale est maintenue constante, l'énergie cinétique est modifiée en conséquence. Cette modification de l'énergie cinétique correspond à une variation de la température (équation I.3.5.3).

Dès lors la conformation pour laquelle l'énergie cinétique, donc la température, sera maximale correspondra au minimum d'énergie potentielle. Pour une énergie totale identique, plus l'énergie cinétique est élevée, plus l'énergie potentielle est faible.

- Si la température reste constante, l'énergie cinétique reste constante également. La conformation correspondant au minimum d'énergie potentielle possèdera une énergie totale minimale.

Lorsque la dynamique moléculaire s'effectue à 300° K, le déplacement doit être recalculé toutes les femtosecondes (10^{-15} sec). Plus la température est importante, plus l'espace parcouru par unité de temps est élevé, plus l'intervalle de temps doit être court, les interactions atomiques obtenues suite à des déplacements trop grands donnant des énergies énormes.

Malheureusement, un ordinateur puissant ne peut simuler une femtoseconde qu'en un temps de l'ordre d'une seconde, ce qui limite fortement le nombre de conformations obtenues par dynamique moléculaire.

In vivo, une enzyme se replie en un temps moyen d'une milliseconde. Autrement dit, il faudrait 10^{12} secondes de temps de calcul pour simuler le repliement complet d'une protéine, ce qui correspond à quelque trente mille années de temps de calcul.

Si les modifications conformationnelles ne sont pas importantes, un ou deux remplacements ponctuels par exemple, il est possible d'utiliser la dynamique moléculaire pour passer du minimum local au minimum global assez proches l'un de l'autre. Le peu de modifications apportées à la protéine va permettre de passer de la conformation de départ, correspondant au minimum local, à la conformation native, correspondant au minimum global, dans un délai de temps raisonnable pouvant être simulé par dynamique moléculaire.

I.3.6 Conclusions

En disposant d'une structure cristallographique dont la séquence est similaire à celle de l'enzyme étudiée, la minimisation d'énergie potentielle et la dynamique moléculaire peuvent permettre l'élaboration du modèle tridimensionnel de cette enzyme. Une fois le modèle de l'enzyme native terminé, il sera possible de proposer des hypothèses concernant le mécanisme réactionnel. Les mêmes méthodes de simulation pourront alors permettre de vérifier les hypothèses par le remplacement de résidus au niveau du modèle.

L.4. Idée générale du travail

La lactate déshydrogénase de muscle de lapin est une enzyme stéréospécifique qui ne produit que le stéréoisomère "L" du lactate.

Actuellement le modèle, réalisé à partir de la L-LDH de muscle de roussette, est l'une des seules représentations tridimensionnelles de lactate déshydrogénase de muscle de mammifère avec la structure cristallographique de muscle de porc (non publié).

Les renseignements qu'il fournit sur sa structure, son activité et ses liens avec les autres lactate déshydrogénases, sont de ce fait très précieux.

Grâce à ce modèle, il est possible d'élaborer un mécanisme qui explique la stéréospécificité en relation avec la structure tridimensionnelle.

Le but de ce mémoire est de modéliser le changement de la stéréospécificité de la L-LDH de muscle de lapin à partir du modèle tridimensionnel. Les remplacements de certains résidus au sein du site actif de l'enzyme sont réalisés en vue de confirmer les hypothèses proposées sur la modification éventuelle d'activité stéréospécifique.

La modélisation de la modification de cette stéréospécificité est intéressante pour plusieurs raisons :

- D'un point de vue fondamental, elle apportera une meilleure compréhension de tous les mécanismes impliqués dans l'activité catalytique et dans les phénomènes de stéréospécificité.

Les éclaircissements apportés pourront alors servir de point de départ pour d'autres études réalisées au niveau du site actif.

- La validation du modèle proposé, et donc des techniques de modélisation qui ont permis d'établir ce modèle, pourra se réaliser expérimentalement par mutagenèse dirigée et cristallographie aux rayons X.

- Beaucoup de stéréoisomères sont des molécules importantes dans le domaine scientifique et médical. En effet, nombre de ces composés possèdent des propriétés physiques et chimiques différentes suivant le stéréoisomère.

La fabrication exclusive d'un des stéréoisomères permet la conservation des qualités de l'un sans avoir les défauts de l'autre.

De plus, la L-LDH est une enzyme à spécificité plus large que la D-LDH (Simon *et al.*, 1989). En effet, elle accepte un nombre relativement important de substrats différents qui deviendront autant de produits distincts. Cette spécificité a encore été élargie par Wilks *et al.* (1990). Malheureusement, l'enzyme mutante produit toujours le même stéréoisomère.

L'utilisation de techniques récentes et les renseignements apportés sur le mécanisme catalytique enzymatique et ses changements ainsi que sur l'ingénierie des protéines, peut rendre ce travail intéressant. Il s'inscrit dans une perspective de complément aux études réalisées sur cette enzyme.

II MATERIEL ET METHODES

La modélisation de structures tridimensionnelles de protéines nécessite un support informatique. Le nombre élevé de données ainsi que les méthodes permettant leur analyse contraignent l'utilisateur à employer un ordinateur relativement puissant.

II.1 Matériel informatique

Le matériel informatique nous permet :

- de faire appel à une banque de données contenant les coordonnées des atomes des structures cristallographiques connues.
- de modéliser une structure tridimensionnelle par minimisation d'énergie et dynamique moléculaire.
- de visualiser les structures et les modèles sur écran graphique.

Toutes les manipulations sont réalisées sur un "IRIS Personal Computer" (Silicon Graphics). Il possède un processeur de 16 Méga Hertz. Plus de 10 millions d'instructions sont ainsi traitées par seconde. Il est accompagné de deux disques durs pouvant mémoriser chacun 380 millions de caractères (c'est-à-dire 380 Méga Octets). La mémoire centrale dispose de 12 Méga Octets. "Unix 2" est utilisé comme système d'exploitation.

II.1.1 Banques de données

Une banque de données, la "Protein data Bank (PDB du "brookhaven National laboratory" de Cambridge, USA), contient les coordonnées cartésiennes des atomes lourds de 434 structures macromoléculaires déterminées par cristallographie (juillet 1989).

II.1.2 Logiciels de modélisation

Plusieurs logiciels sont utilisés dans la technique de modélisation de protéines. Le laboratoire dispose de INSIGHT II et DISCOVER (Biosym, San Diego). Ces deux logiciels peuvent s'employer séparément ou simultanément.

II.1.2.1 INSIGHT II

Le rôle du logiciel INSIGHT II est double :

- Tout d'abord, il peut être utilisé pour construire une nouvelle molécule à partir d'une librairie contenant les coordonnées atomiques d'une série de molécules organiques, de tous les acides aminés, ainsi que de certains radicaux et atomes. Ces molécules peuvent alors être manipulées visuellement par l'utilisateur.

- Ensuite, il permet la visualisation de molécules en trois dimensions à partir des coordonnées cristallographiques des atomes ou des coordonnées de modèles réalisés précédemment. Ces représentations graphiques peuvent alors être manipulées et transformées. Elles peuvent être stockées sous forme de fichiers utilisables par le logiciel de modélisation DISCOVER ou sous forme d'images. Le logiciel INSIGHT II est la plaque tournante entre l'utilisateur et DISCOVER. En effet, il crée deux fichiers indispensables pour que la molécule puisse être reconnue et traitée par DISCOVER. Le premier fichier contient toutes les coordonnées atomiques, et le second les paramètres assignés à chaque atome en fonction du Force Field utilisé ainsi que les connections entre chaque atome.

II.1.2.2 DISCOVER

Le logiciel DISCOVER réalise les minimisations d'énergie et les dynamiques moléculaires à partir des deux fichiers préparés par INSIGHT II. Le Force Field utilisé dans ce mémoire est le "Consistent Valence Force Field" ou CVFF (Hagler *et al.*, 1979). DISCOVER réalise les calculs sur base d'un fichier de commande écrit par l'utilisateur dans une syntaxe propre au logiciel DISCOVER. Ce fichier contient toutes les instructions nécessaires à la concrétisation du travail demandé.

L'utilisateur peut enfin aller consulter l'ensemble des résultats de la simulation dans un fichier "Output".

II.2 Remplacements de résidus

Le remplacement d'un résidu par un autre sur un modèle tridimensionnel se réalise, dans le logiciel INSIGHT II, de la manière suivante :

- Lorsqu'un résidu est remplacé, les angles de valence du squelette du nouvel acide aminé sont alignés sur l'original.

- Les angles de la chaîne latérale que les deux résidus ont en commun sont ensuite alignés. Des valeurs arbitraires sont données aux autres angles du nouveau résidu et correspondent à une position énergétiquement favorable. Si les valeurs d'angles, attribuées de cette manière, provoquent des encombrements stériques, elles seront modifiées de manière à supprimer ces interactions.

- Une charge partielle est assignée à chaque atome du résidu remplacé.

Pour finir, les deux fichiers nécessaires à DISCOVER sont créés.

Il faut alors créer un fichier "Input" permettant à Discover de balayer toutes les conformations possibles des angles de torsions afin de trouver la conformation du résidu remplacé qui possède la plus faible énergie. Cela permet de réduire le temps nécessaire à la minimisation d'énergie en s'approchant du minimum.

De plus, cette recherche systématique permet de franchir les barrières énergétiques qui peuvent exister entre la conformation de départ et la conformation réelle du résidu dans l'enzyme mutante.

La fonction "Rotor", dans DISCOVER, est employée pour ce genre de travail :

- Cette fonction change la valeur de chaque angle de torsion en y ajoutant une valeur imposée par l'utilisateur.

- L'énergie potentielle de la molécule est recalculée.

- Ensuite, une nouvelle rotation est pratiquée. La nouvelle énergie potentielle est calculée ; et ainsi de suite jusqu'à avoir accompli 360°.

- La conformation dont l'énergie est la plus faible est choisie comme point de départ pour la minimisation d'énergie.

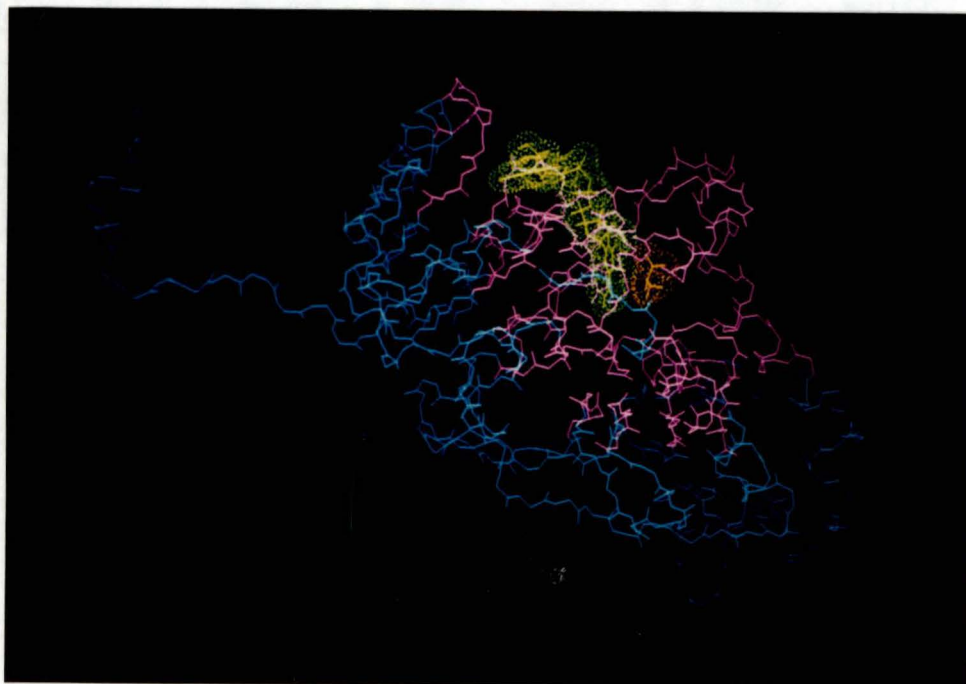


Figure 19

La minimisation d'énergie potentielle se réalise sur les résidus se situant dans une sphère de 15 Å autour du carbone du carbonyle du pyruvate (en mauve). Les autres résidus sont fixés et donc n'interviennent pas dans les calculs. Le coenzyme est en vert, le substrat en orange.

La fonction "Rotor" peut être pratiquée sur plusieurs angles de torsions à la fois. Une fois la valeur des angles de la conformation la plus favorable connue, l'utilisateur reprend la molécule de départ dans le logiciel INSIGHT II, donne aux angles de torsions les valeurs obtenues par la fonction "Rotor" et crée les deux fichiers nécessaires à la minimisation d'énergie.

II.3 Déplacement du substrat

Le modèle de la lactate déshydrogénase de muscle de lapin contient le lactate dans sa position native. Afin de changer la stéréospécificité de l'enzyme, nous avons appliqué au pyruvate une rotation de 180° autour de l'axe C-O du carbonyle. Les raisons en sont données dans le chapitre de résultats et discussions.

La rotation du pyruvate se réalise dans la logiciel INSIGHT II à l'aide de la fonction "Rotate". Cette fonction permet la rotation d'un objet autour d'un axe choisi. Si le retournement du pyruvate entraîne des encombrements stériques, le substrat sera translaté de manière arbitraire.

II.4 Minimisation d'énergie

DISCOVER possède plusieurs méthodes de minimisation d'énergie. Les deux utilisées dans ce travail sont le "steepest descent" et le "conjugate gradient". Lors de la minimisation plusieurs paramètres sont importants:

- La fonction "Constrain" est utilisée afin de contraindre la distance entre l'oxygène du carbonyle du pyruvate et l'hydrogène de l'histidine 195 à une valeur proche de 2,5 Å, qui représente la longueur maximale pour un pont H acceptée par le logiciel InsightII. Ce pont hydrogène est nécessaire au mécanisme réactionnel (voir chapitre I.2.6.5).

- La modélisation d'une LDH mutante se réalise en minimisant le site actif seul, c'est-à-dire en fixant les résidus éloignés du substrat. Les atomes situés à l'extérieur d'une sphère dont la centre est le pyruvate et dont le rayon est égal à 15 Å, sont fixés (figure 19). Quelques résidus situés à une distance supérieure à 15 Å ne sont néanmoins pas fixés car ils entourent le coenzyme.

Les résidus fixés de l'enzyme sont les suivants : 1 à 25, 37 à 49, 59 à 92, 118 à 133, 146 à 158, 174 à 186, 200 à 225, 257 à 267, 272 à 284, 289 à 315, 324 à 329.

Les molécules d'eau fixées sont les suivantes : 4 à 10, 17 à 19, 22 et 23, 28, 30 à 33, 36, 39 à 41, 44 et 45.

En effet, ces résidus et ces molécules n'ont pratiquement pas d'influence sur le site actif. La fixation dans leur conformation native n'entraîne donc pas d'erreur en première approximation dans la création du modèle mutant. Une fois fixés, ils n'interviennent plus dans le calcul de l'énergie.

Les calculs sont, de ce fait, plus rapides. Le temps épargné par cette fixation n'est pas négligeable.

- Le mécanisme de la minimisation d'énergie est constitué d'une suite d'itérations. Une itération consiste à calculer le gradient négatif de l'énergie potentielle de tous les atomes de la molécule, ensuite à déplacer ces atomes le long de ce gradient jusqu'à atteindre un minimum.

La minimisation d'une protéine mutée nécessite un nombre important d'itérations. Or, chaque itération demande plusieurs secondes de temps calcul. En moyenne, mille itérations prennent dix heures de temps calcul. Le temps de minimisation se révèle très vite être le principal facteur limitant de la modélisation de grosses molécules.

Parmi les informations qu'il est possible d'obtenir en cours de minimisation, se trouve l'énergie potentielle du modèle. Cette énergie potentielle est décomposée en une somme d'énergies associées à chaque type d'interaction.

De cette manière, nous pouvons détecter les interactions possédant une énergie potentielle particulièrement élevée.

Dans ce travail, les énergies potentielles finales des différents modèles sont comparées afin de pouvoir tirer des conclusions sur les conséquences des modifications apportées à la protéine.

La valeur absolue maximale de la dérivée de l'énergie attribuée à un atome (la dérivée maximum) reflète l'état dans lequel se situe le modèle. Si un atome est soumis à une force importante qui déstabilise la structure, la dérivée de son énergie potentielle est élevée. Cette dérivée renseigne donc l'utilisateur à propos des tensions présentes dans la molécule.

La dérivée moyenne de l'énergie potentielle nous renseigne sur l'état dans lequel se trouve le modèle.

Lorsque la valeur de la dérivée maximum est inférieure à 0,01 en valeur absolue, on considère la minimisation comme terminée.

- Le nombre d'interactions non covalentes au sein d'une protéine est très important. Or, nous avons vu que ces interactions deviennent négligeables à grande distance. C'est pourquoi nous fixons une valeur pour la distance interatomique, au delà de laquelle l'énergie est considérée comme nulle. La valeur de cette distance est de 10 Å dans la totalité des simulations.

La valeur de la constante diélectrique est égale à la distance séparant les atomes de manière à simuler l'effet des molécules d'eau. Le modèle se réalise en absence de solvant extérieur car ce dernier augmenterait considérablement le nombre d'atomes mis en présence et donc le temps de calcul (Seules les molécules d'eau constitutives sont présentes). Sous vide, les interactions électrostatiques ne sont pas atténuées par le solvant qui joue un rôle d'écran entre les différents résidus de la surface de la protéine. En absence de cet écran, des atomes pourraient subir des forces électrostatiques exagérées. Afin de réduire au maximum ce phénomène, nous rendons la constante diélectrique directement proportionnelle à la distance qui sépare deux atomes. Les interactions électrostatiques sont alors inversement proportionnelles au carré de cette distance. Ainsi, elles seront toujours présentes entre deux atomes proches, alors qu'elles seront très faibles entre deux atomes éloignés.

II.5 Dynamique moléculaire

La méthode de dynamique moléculaire employée par DISCOVER simule le mouvement de la protéine à la température imposée par le manipulateur. Cette valeur reste constante durant toute la dynamique. L'énergie totale et la température seront suivies tout au long de la simulation. Elles permettent la visualisation des différentes barrières énergétiques et minima rencontrés.

Elle montre la tendance que possède un atome à se déplacer dans un modèle. En effet, elle consiste à déplacer chaque atome dans la direction indiquée par la force qu'il subit.

Durant chaque "step", les atomes sont déplacés dans la direction de la force qu'ils subissent pendant un temps correspondant, en général, à une femtoseconde (10^{-15} sec.) de temps réel. L'ordinateur dont nous disposons est capable de calculer la valeur de ce déplacement en un temps proche de la demi-minute. Par exemple, une simulation de 3000 "steps", qui est le nombre requis pour notre simulation, se réalise en 25 heures de temps de calcul. Afin de réduire ce temps, la dynamique moléculaire ne s'effectuera que sur les résidus non fixés lors de la minimisation d'énergie.

La température est le paramètre le plus important de la dynamique moléculaire. Elle détermine la valeur de l'énergie cinétique et donc le niveau d'agitation des atomes. Plus elle est importante, plus l'énergie fournie aux atomes est élevée, plus la chance de dépasser les barrières énergétiques est grande.

Une température trop élevée peut entraîner des valeurs d'énergie totale très élevées et donc provoquer un arrêt du processus de dynamique moléculaire, des valeurs proches de l'infini pouvant provoquer des erreurs importantes de calcul.

$E + S_0$: L'enzyme non modifiée avec le substrat dans sa position native.

$E + S_{180}$: L'enzyme non modifiée avec le substrat ayant subi une rotation de 180° .

$E_m + S_0$: L'enzyme modifiée avec le substrat dans sa position native.

$E_m + S_{180}$: L'enzyme modifiée avec le substrat ayant subi une rotation de 180° .

N.B: Modifiée = ayant subi des remplacements de certains résidus.

Un compromis sera donc établi afin d'obtenir un déplacement sans pour autant provoquer une augmentation incontrôlable de l'énergie. La température est choisie en général entre 300 et 600 °K.

La dynamique moléculaire commence par une initialisation. Une vitesse atomique due au hasard est choisie suivant la distribution de Boltzmann et la température demandée par l'utilisateur. Le système est équilibré à cette température.

L'initialisation est aussi utilisée pour déterminer certains paramètres associés à la dynamique, à savoir :

- Le choix de la fonction harmonique ou de la fonction morse pour le calcul de l'énergie associée aux liaisons covalentes.
- Le choix de la taille des steps. Sa valeur par défaut est de une femtoseconde.
- Le choix entre une simulation à température ou à énergie constante.

Lors de l'initialisation et de la dynamique proprement dite, les informations structurales et énergétiques sont régulièrement stockées dans un fichier.

Après la simulation, il suffit de lire ce fichier à partir d'INSIGHT II. L'animation de toutes les conformations emmagasinées permet de suivre graphiquement le trajet parcouru par tous les atomes.

Des graphiques bi- ou tri-dimensionnels peuvent être associés à cette trajectoire. Ils peuvent représenter l'énergie et/ou la température en fonction du temps.

Ces graphiques permettent donc de déceler les conformations correspondant aux minima d'énergie potentielle. L'énergie de cette conformation peut alors être minimisée et comparée à celle de la conformation de départ.

II.6 Interprétation des résultats

Différents modèles de la lactate déshydrogénase sont comparés :

- L'enzyme non modifiée ayant son substrat, le pyruvate, dans sa position normale (rotation de 0°) : **E + S₀**.
- L'enzyme non modifiée, avec le pyruvate ayant subi une rotation de 180° autour de l'axe C-O du carbonyle : **E + S₁₈₀**.
- L'enzyme modifiée (dont certains résidus sont remplacés), avec le substrat dans sa position normale (rotation de 0°) : **E_m + S₀**.
- L'enzyme modifiée, avec le pyruvate ayant subi une rotation de 180° : **E_m + S₁₈₀**.

Ces modèles sont comparés en analysant :

- L'énergie potentielle totale du modèle après minimisation.
- Les dérivées maximum et moyenne de cette énergie potentielle après minimisation.
- L'énergie potentielle totale par molécule.
- L'énergie potentielle totale par résidu.
- L'énergie d'interaction totale entre le substrat et l'enzyme.
- L'énergie d'interaction par résidu décomposée en énergie de VDW et électrostatique.

Tous les modèles vont être comparés les uns aux autres suivant tous ces critères. Des conclusions pourront alors être tirées à propos de l'effet de remplacements sur la stéréospécificité de la L-LDH.

De plus, la description détaillée des sites actifs permettra l'obtention de renseignements sur l'influence de leurs résidus sur le mécanisme réactionnel des quatre modèles.

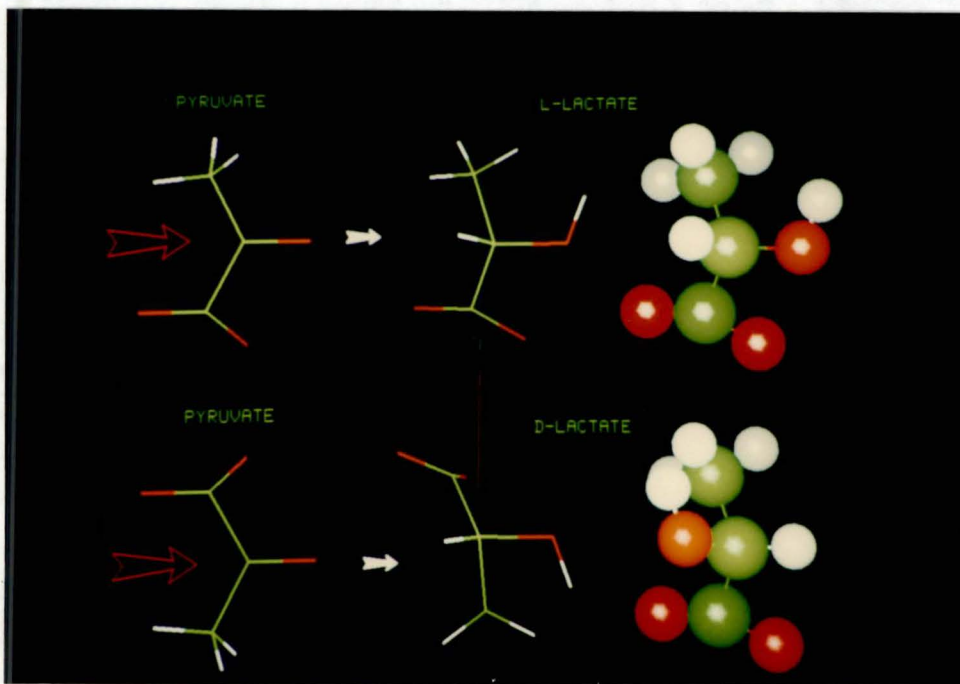


Figure 20

Production de L-lactate par la L-LDH de muscle de lapin et de D-lactate par la L-LDH de muscle de lapin si le substrat était positionné à l'envers. L'attaque nucléophile se réalise perpendiculairement au plan de la photo à l'endroit indiqué par les flèches rouges.

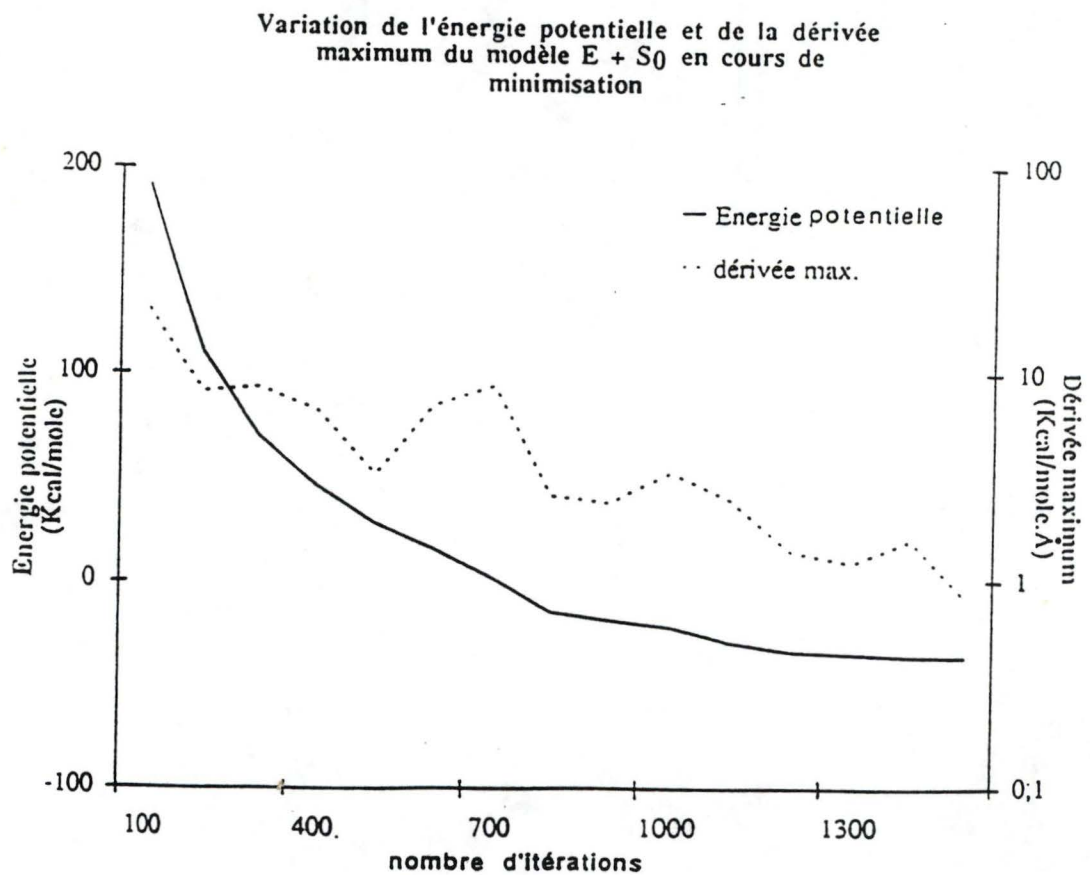


Figure 21

Evolution de l'énergie potentielle totale et de la dérivée maximum de l'énergie potentielle du modèle $E + S_0$ lors du début de la minimisation de l'énergie.

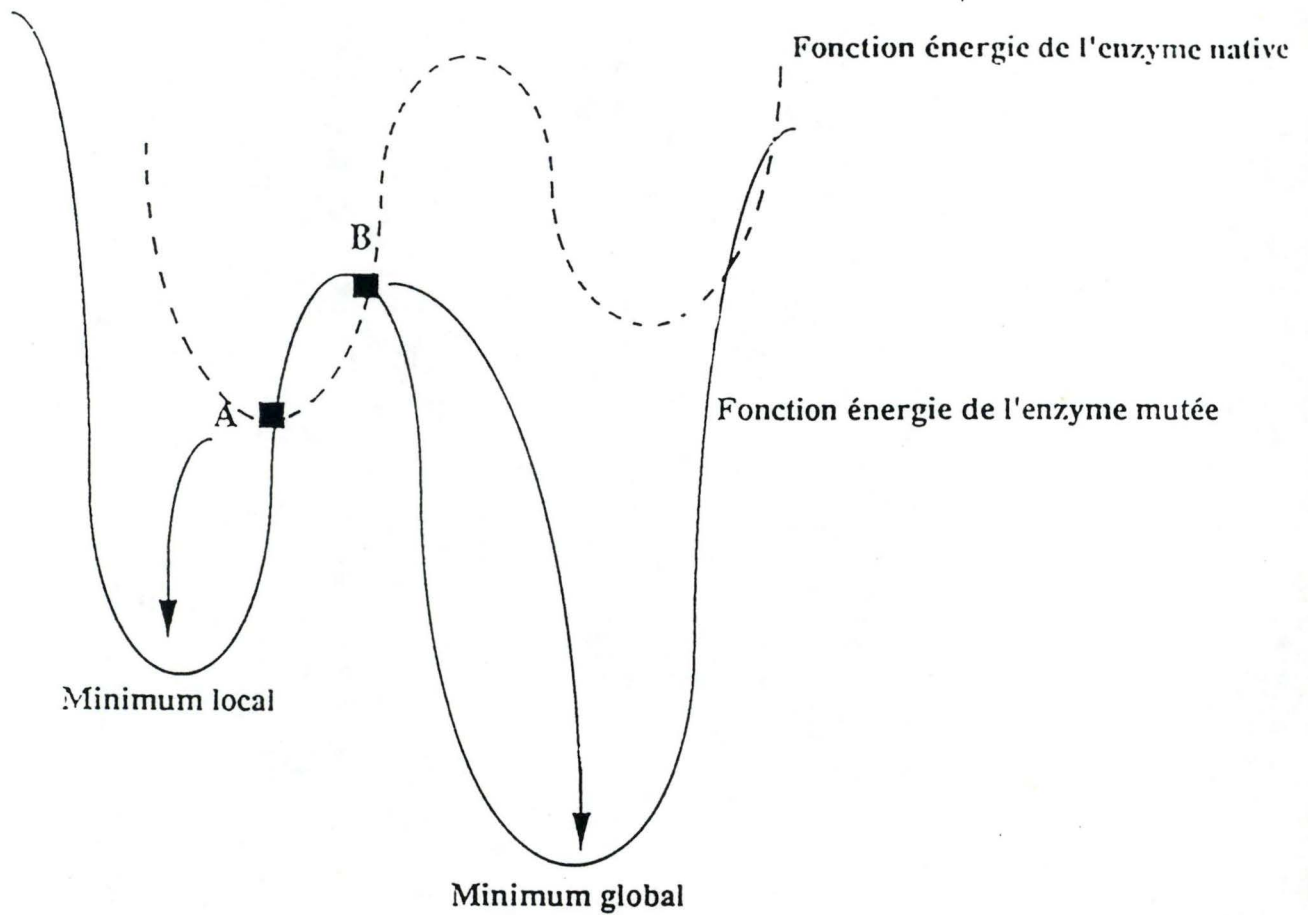


Figure 22

Si on remplace un résidu dans un modèle qui possède une énergie potentielle proche du minimum (situation A), la minimisation d'énergie risque d'aboutir à un minimum local. Ce minimum local correspond à une conformation très proche de celle du modèle de départ. Par contre, si on remplace un résidu dans un modèle qui possède une énergie potentielle éloignée du minimum (situation B), la minimisation d'énergie peut aboutir au minimum global.

III RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1 Caractéristiques générales du modèle de la L-LDH de muscle de lapin

Deux paramètres entrent en ligne de compte pour expliquer la stéréospécificité de la L-LDH : l'hydrogène du NADH qui est transféré et la position du pyruvate. Comme nous pouvons le voir à la figure 20, ces deux caractéristiques entraînent automatiquement la transformation du pyruvate en L-lactate.

Par contre, si le substrat se positionnait dans le site actif en effectuant une rotation de 180 degrés autour de l'axe C-O du carbonyle (voir figure 20) l'enzyme transformerait le pyruvate en D-lactate. Le substrat, lorsqu'il a pivoté de 180°, offre, au NADH le côté opposé de son carbonyle. L'ion hydrure attaquerait donc ce côté du carbonyle, provoquant la formation de D-lactate.

La dérivée maximum de l'énergie potentielle du modèle de la lactate déshydrogénase de muscle de lapin, se situe aux environs de 1 Kcal/mole.Å (figure 21). Cela signifie que la minimisation est loin d'être terminée. Un modèle est considéré comme minimisé lorsque sa dérivée maximum est inférieure à 0,01 Kcal/mole.Å.

L'utilisation de ce modèle non affiné comme point de départ de toutes les manipulations s'explique de la manière suivante : si, lorsqu'un résidu est remplacé, l'énergie potentielle est trop faible, la minimisation d'énergie provoque généralement la convergence de la conformation de l'enzyme mutée vers celle de la protéine native. Cette conformation correspond à un minimum local d'énergie et peut donc être fort éloignée de la réalité. L'explication de ce phénomène se trouve à la figure 22.

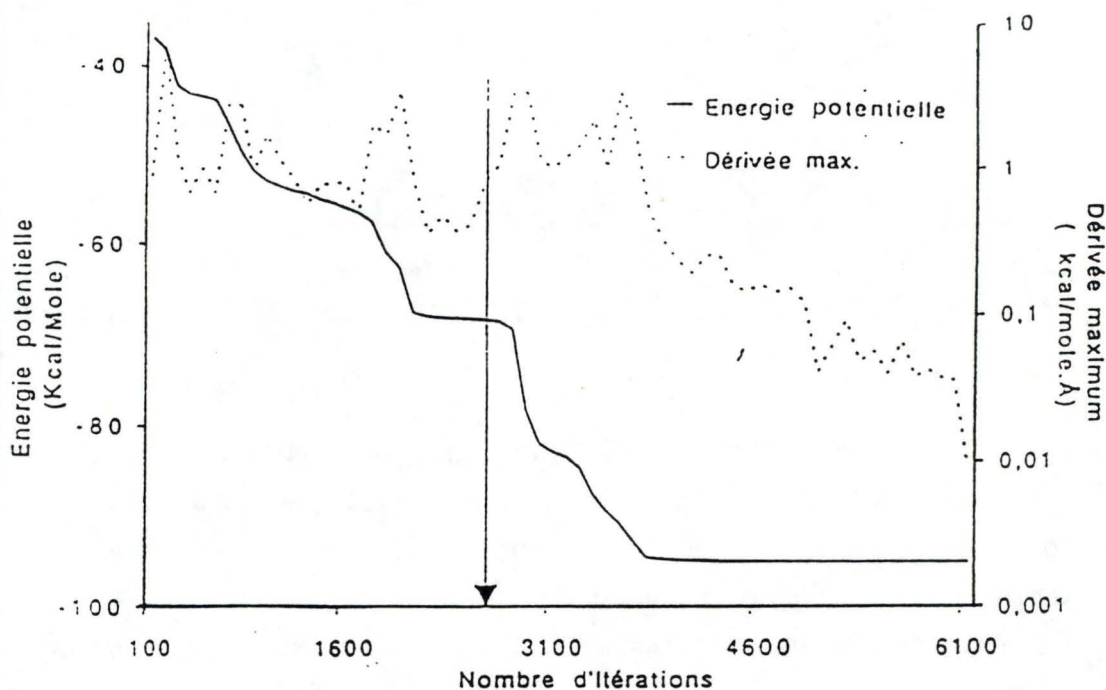
III.2 Modèles non modifiés

Afin de mieux comprendre le phénomène de stéréospécificité, plusieurs expériences vont être réalisées à partir du modèle non affiné :

- D'une part, nous allons affiner le modèle E + S₀ afin d'obtenir la conformation correspondant au minimum d'énergie potentielle.

Variation de l'énergie potentielle et de la dérivée maximum du modèle E + S₀ en cours de minimisation

a)



Variation de l'énergie potentielle et de la dérivée maximum du modèle E + S₁₈₀ en cours de minimisation

b)

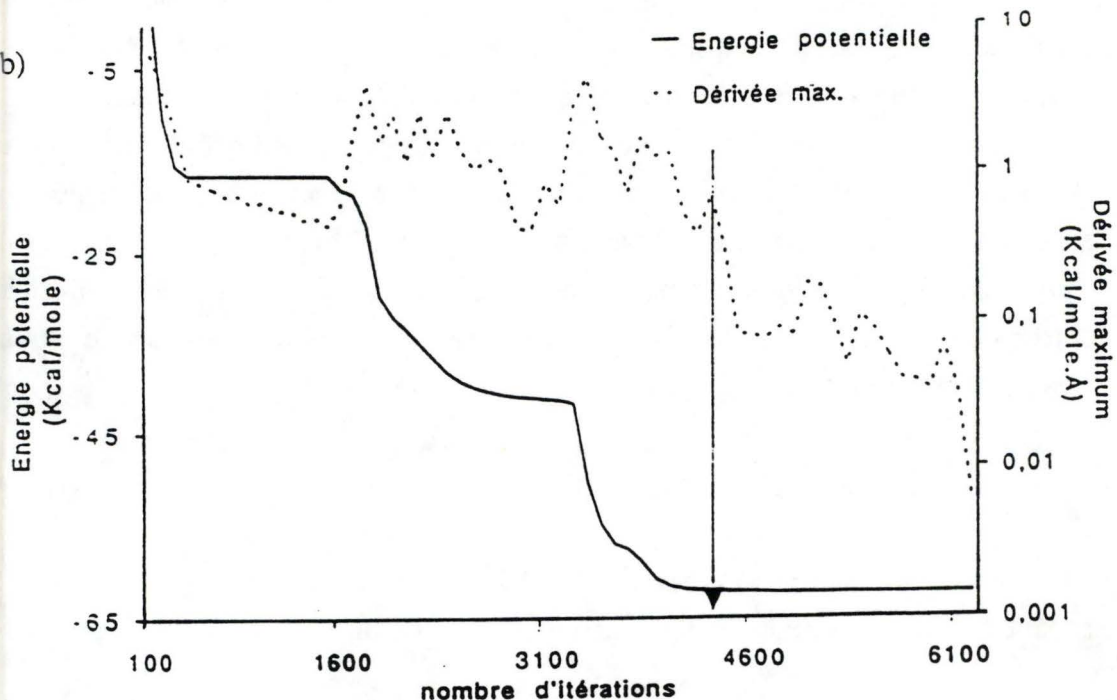
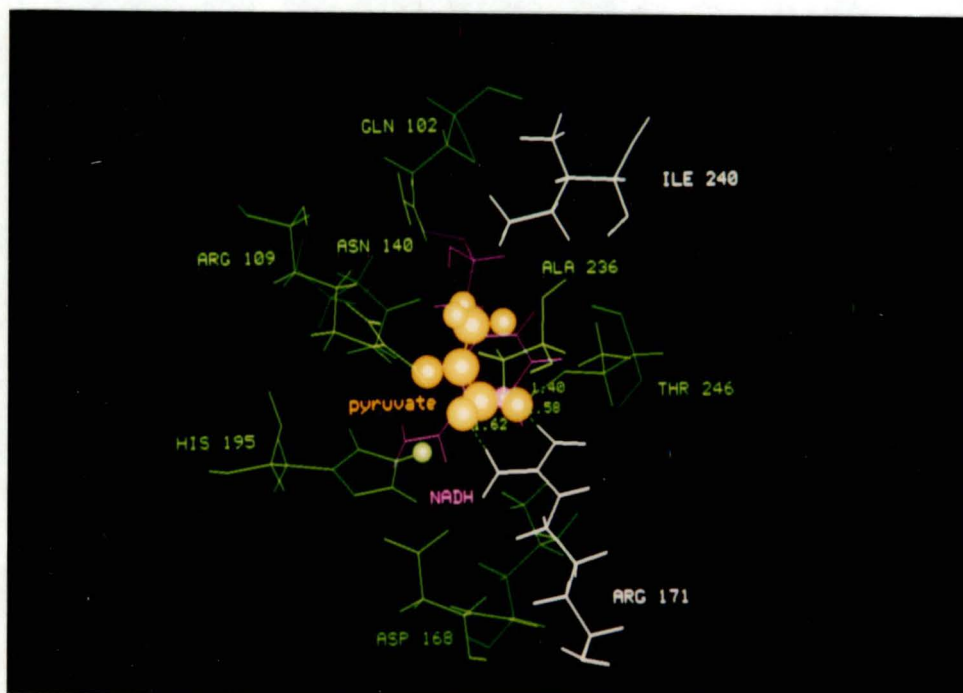


Figure 23

- a) Evolution de l'énergie potentielle du site actif et de la dérivée maximum d'énergie potentielle du modèle E + S₀ lors de la minimisation d'énergie.
- b) Evolution de l'énergie potentielle du site actif et de la dérivée maximum d'énergie potentielle du modèle E + S₁₈₀ lors de la minimisation d'énergie.

a)



b)

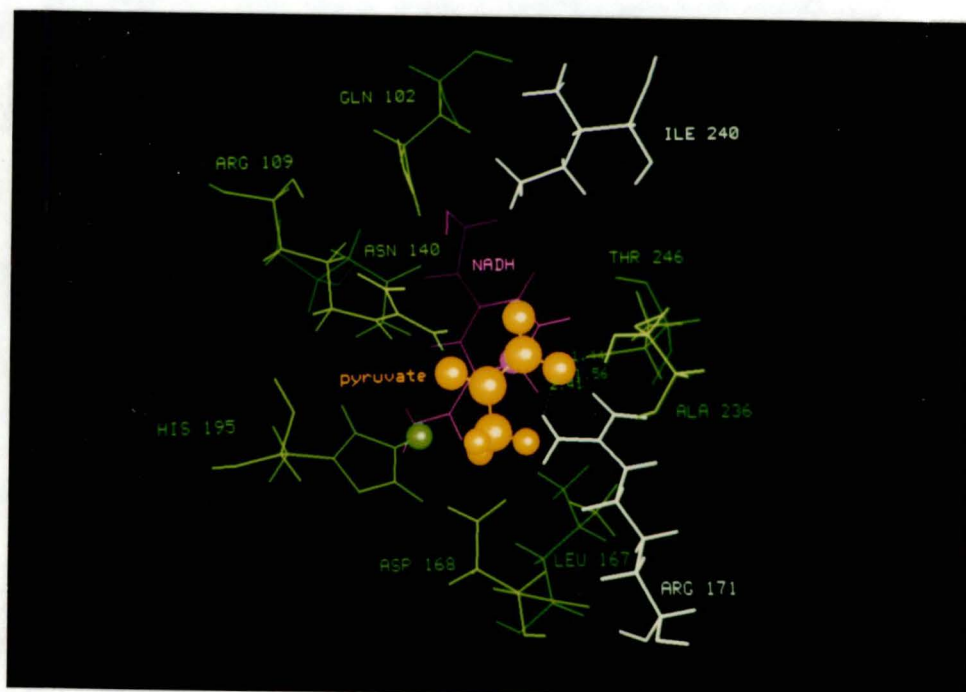


Figure 24

a) Représentation du site actif du modèle minimisé E + S₀.

b) Représentation du site actif du modèle minimisé E + S₁₈₀.

Le substrat est en orange, le NADH en mauve, les résidus qui seront remplacés en blanc et les autres en vert. Les ponts hydrogènes liant le carboxyle du pyruvate sont présents. L'hydrogène du NADH responsable de l'attaque nucléophile est représenté par une sphère mauve. L'hydrogène de l'histidine 195 responsable de la délocalisation de la double liaison de carbonyle du pyruvate est représenté par une sphère verte.

- De l'autre, nous allons modéliser, également à partir du modèle non affiné, l'enzyme avec son substrat ayant subi, au départ, une rotation de 180° autour de l'axe Carbone-Oxygène du carbonyle (E + S180).

Une fois ces deux modèles réalisés, nous pourrions les comparer du point de vue structurel et énergétique.

III.2.1 Les modélisations

Les modélisations sont réalisées d'une manière identique pour tous les modèles, par minimisation d'énergie des seuls résidus proches du site actif (les résidus se situant dans un rayon de 15 Å autour du carbone du carbonyle du pyruvate), jusqu'à l'obtention d'une dérivée maximum de l'énergie potentielle inférieure à 0,01 Kcal/mole.Å (voir matériel et méthodes).

Au début de la minimisation, la distance entre l'oxygène du carbonyle du pyruvate et l'hydrogène de l'histidine 195, est maintenue à une valeur proche de 2,5 Å. Cette distance représente la longueur d'un pont H entre les deux atomes. Ce pont hydrogène est nécessaire au mécanisme réactionnel (voir chapitre I.2.6.5).

Les évolutions de l'énergie potentielle du site actif et de la dérivée maximum de cette énergie lors de la minimisation d'énergie, sont représentées à la figure 23.

Les flèches indiquent le moment où la contrainte de distance a été supprimée. La contrainte est enlevée lorsque la distance ne varie quasiment plus.

En fin de minimisation, l'énergie potentielle ne se modifie plus que très faiblement, mais la dérivée maximum diminue et atteint une valeur inférieure à 0,01 Kcal/mole.Å, ce qui semble indiquer que le minimum d'énergie est presque atteint.

III.2.2 Comparaison structurelle des deux sites actifs

La figure 24 montre les sites actifs des deux modèles après minimisation d'énergie. Plusieurs éléments restent identiques, alors que d'autres varient :

- Les éléments identiques sont les suivants :
 - L'hydrogène réactionnel du NADH se trouve à 2,7 Å du carbone du carbonyle du substrat.
 - La leucine 167, résidu hydrophobe, semble interagir avec le noyau nicotinamide du NADH.

- Le éléments différents sont les suivants :

- le carboxyle du pyruvate (qui possède deux hydrogènes : H1 et H2) est maintenu par plusieurs ponts H :

Table 1

E + S0		E + S180	
Atomes et résidus impliqués	distance	Atomes et résidus impliqués	distance
l'hydrogène HH11 de l'arginine 171 et l'oxygène O1 du carboxyle du pyruvate	1,6 Å	l'hydrogène HH21 de l'arginine 171 et l'oxygène O2 du carboxyle du pyruvate	1,6 Å
l'hydrogène HH21 de l'arginine 171 et l'oxygène O2 du carboxyle du pyruvate	1,6 Å	l'hydrogène HH11 de l'arginine 171 et l'oxygène O2 du carboxyle du pyruvate	2,4 Å
l'hydrogène HG1 de la thréonine 246 et l'oxygène n°2 du carboxyle du pyruvate	1,6 Å	l'hydrogène HG1 de la thréonine 246 et l'oxygène O2 du carboxyle du pyruvate	1,5 Å

- En outre, d'autres ponts H conservés possèdent des distances modifiées :

Table 2

	E + S0	E + S180
L'arginine 109 stabilise le carboxyle du substrat par un pont H d'une longueur de :	1,8 Å	2,3 Å
L'hydrogène de l'histidine 195 est séparé de l'oxygène du carbonyle du pyruvate par une distance de :	2,7 Å	2,9 Å
L'aspartate 168 interagit avec l'his 195 à l'aide d'un pont H dont la distance entre atomes lourds vaut :	3,3 Å	3,5 Å

N.B: On considère la possibilité de l'existence d'un pont H lorsque les atomes impliqués sont séparés d'une distance égale aux valeurs standard ± 1 Å.

- De plus, d'autres résidus interagissent avec le substrat. La glutamine 102, l'asparagine 140, l'alanine 236 et l'isoleucine 240 forment une poche autour du méthyle du pyruvate dans le modèle E + S₀. Ces résidus sont probablement impliqués dans la reconnaissance du substrat. Ils forment également une poche autour du carboxyle du pyruvate dans le modèle E + S₁₈₀.

Comme nous pouvons le voir dans ces chiffres, les ponts H sont plus fréquents et possèdent une distance plus faible dans E + S₁₈₀. Une comparaison approfondie des énergies des deux modèles est nécessaire pour aboutir à une meilleure compréhension de la stéréospécificité de la L-LDH de muscle de lapin et ainsi expliquer le fait que l'enzyme ne produit que du L-lactate.

III.2.3 Comparaison des énergies des deux modèles

Le modèle obtenu E + S₁₈₀ est comparé au modèle de l'enzyme native (E + S₀) par analyse des énergies suivantes: énergie potentielle totale, énergie potentielle totale par molécule, énergie potentielle totale par résidu, énergie d'interaction totale entre le substrat et l'enzyme, énergie d'interaction par résidu, décomposée en énergie de VDW et électrostatique.

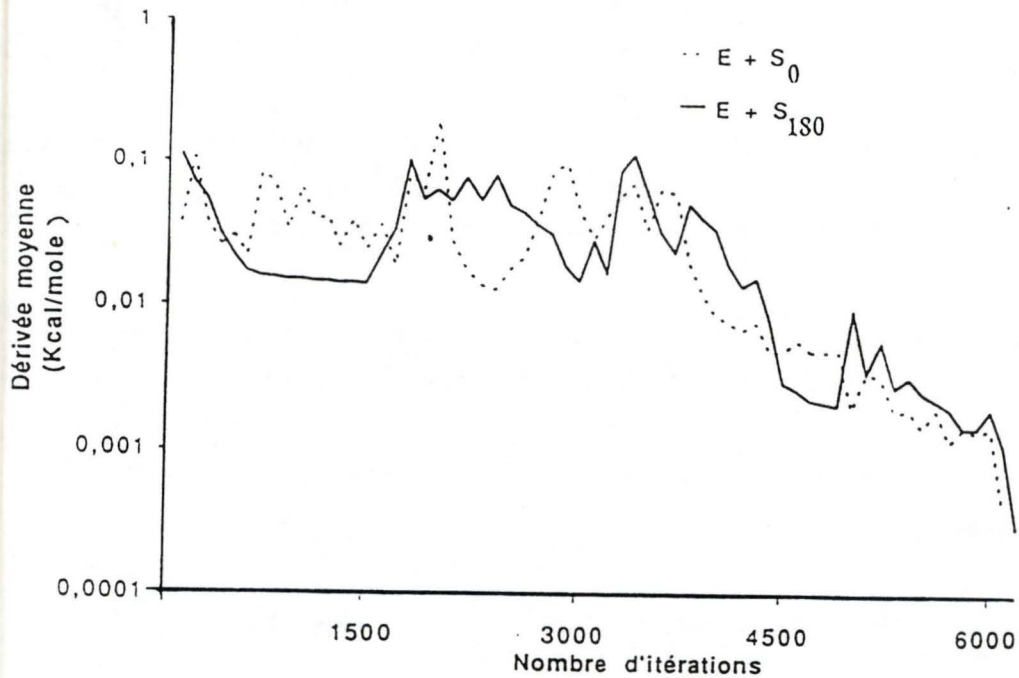
III.2.3.1 Comparaison de l'énergie potentielle totale par molécule

La table ci-après reprend les valeurs d'énergie potentielle et de dérivées maximum et moyenne d'énergie potentielle des deux modèles.

	Energie Potentielle (Kcal/ mole)	
	E + S₀	E + S₁₈₀
MOLECULE		
modèle complet	2258,3	2290,55
site actif	-95,06	-62,37
enzyme	2777,95	2793,32
NADH	-66,26	-66,71
pyruvate	-38,8	-28,24

Variation de la dérivée moyenne des modèles
E + S₀ et E + S₁₈₀ en cours de minimisation

a)



b)

Variation de l'énergie potentielle des modèles
E + S₀ et E + S₁₈₀ en cours de minimisation

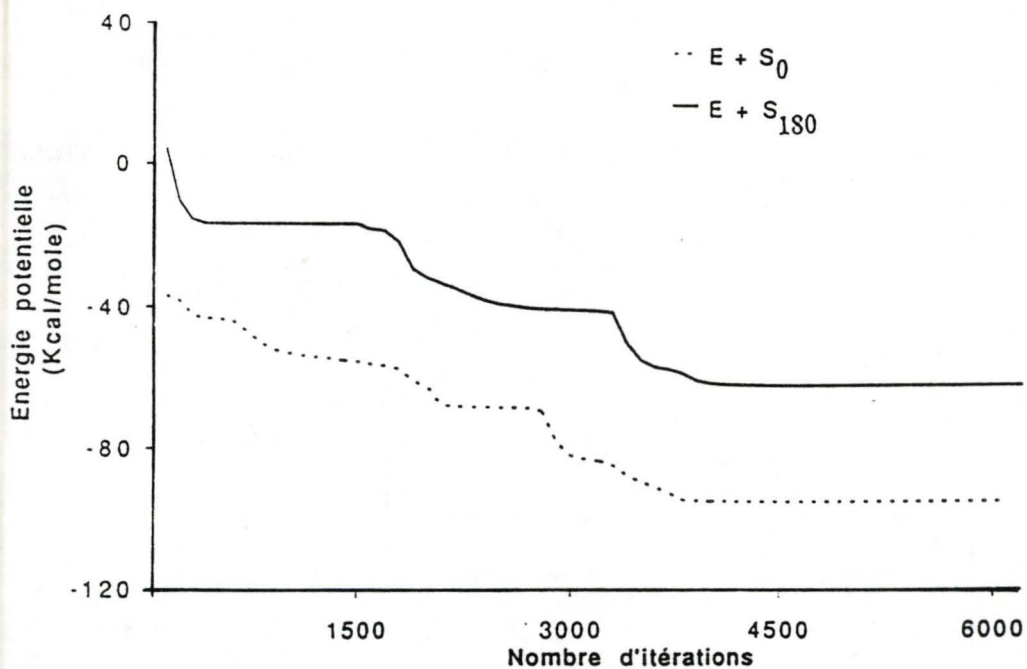
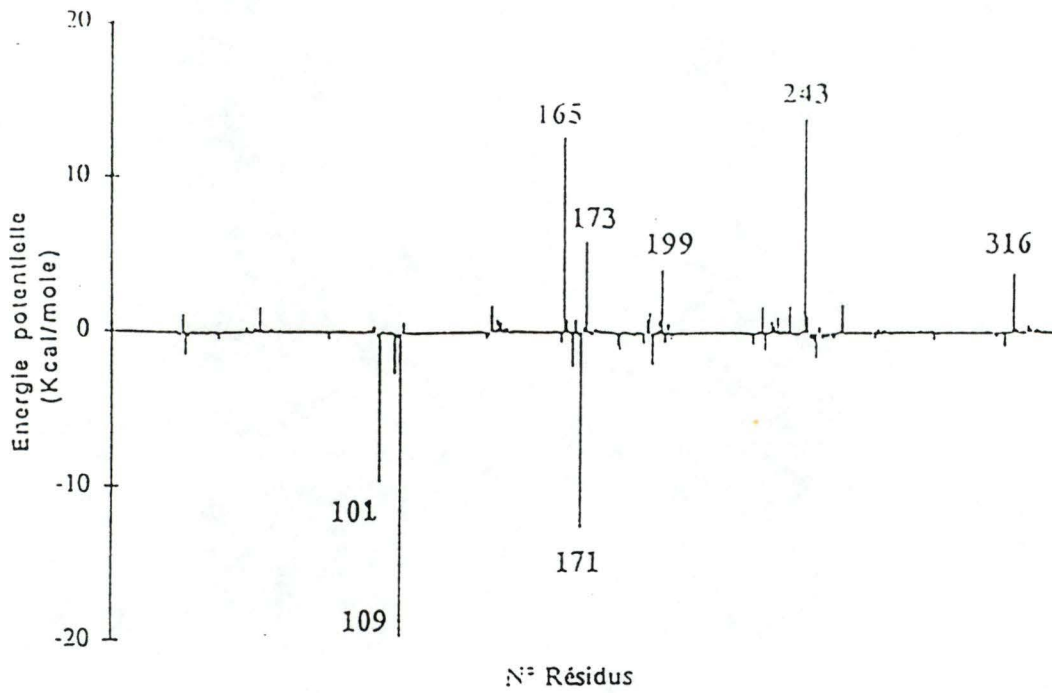


Figure 25

- a) Comparaison de la dérivée moyenne d'énergie potentielle des modèles E + S₀ et E + S₁₈₀ lors de la minimisation d'énergie.
 b) Comparaison de l'énergie potentielle des modèles E + S₀ et E + S₁₈₀ lors de la minimisation d'énergie.

Différence d'énergie potentielle par résidu :
 $(E + S_{180}) - (E + S_0)$

a)



Différence d'énergie d'interaction avec le pyruvate par résidu : $(E + S_{180}) - (E + S_0)$

b)

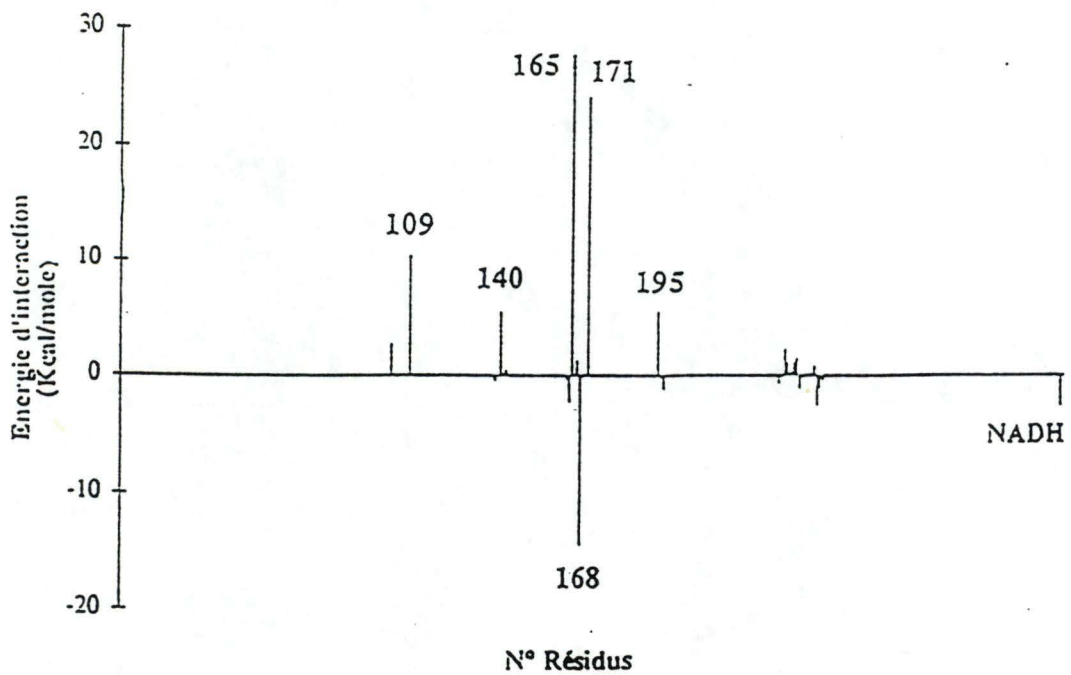


Figure 26

a) Différence d'énergie potentielle par résidu entre les modèles E + S180 et E + S0.

b) Différence d'énergie d'interaction par résidu avec le pyruvate entre les modèles E + S180 et E + S0.

DERIVEE (Kcal/mole.Å)	E + S₀	E + S₁₈₀
Dér. max.	0,009	0,006
Dér. moy.	0,0004	0,0004

La dérivée moyenne de l'énergie potentielle est identique (figure 25), ce qui signifie que les deux modèles se situent à un niveau comparable de la minimisation.

Les observations suivantes peuvent être faites :

- L'énergie potentielle du modèle E + S₀ est inférieure d'environ 30 Kcal/mole à celle du modèle E + S₁₈₀ (voir figure 25).
- L'énergie potentielle du site actif du modèle E + S₀ est inférieure d'environ 30 Kcal/mole à celle du site actif du modèle E + S₁₈₀.
- L'énergie potentielle de l'enzyme seule est supérieure de 15 Kcal/mole dans E + S₁₈₀.
- L'énergie potentielle du pyruvate augmente de 10 Kcal/mole lors du passage de E + S₀ à E + S₁₈₀.
- Par contre, l'énergie potentielle du coenzyme ne change pas.

En conclusion, la différence d'énergie potentielle entre les deux modèles se situe entièrement au niveau du site actif, et plus précisément au niveau des résidus de ce site et du pyruvate. Par contre, le coenzyme ne semble pas être influencé par la rotation du substrat. Cette différence est en accord avec l'hypothèse du mécanisme stéréospécifique de l'enzyme.

III.2.3.2 Comparaison des énergies potentielles par résidu

Nous avons comparé les énergies potentielles totales par résidu ainsi que les énergies d'interaction avec le substrat dans les deux modèles.

A la figure 26 se trouve la différence des énergies totales par résidu et la différence des énergies d'interaction avec le pyruvate entre E + S₁₈₀ et E + S₀.

Une interaction plus défavorable s'accompagne d'une énergie potentielle plus élevée. Donc, lorsqu'un résidu possède une énergie potentielle plus faible dans le modèle E + S₁₈₀ que dans E + S₀ (c'est-à-dire lorsque la différence d'énergie est négative entre [E + S₁₈₀] et [E + S₀]), l'interaction avec son entourage lors de la rotation du pyruvate est énergétiquement plus favorable.

Les informations suivantes peuvent être tirées de ces différences d'énergies :

- L'arginine 101 possède une énergie potentielle totale plus faible après la rotation du substrat. La différence d'énergie négative provoquée par la rotation est due à une énergie d'interaction moins élevée avec le NADH.
- L'arginine 109 possède une énergie d'interaction avec le pyruvate plus élevée lorsque le substrat a subi une rotation de 180°. Par contre l'éloignement du résidu 109 par rapport à l'arginine 171 entraîne une chute assez importante de l'énergie potentielle totale de l'arginine 109.
- L'asparagine 140 possède une énergie d'interaction moins élevée dans le modèle E + S₀.
- La lysine 165 s'éloigne de l'aspartate 168 et du pyruvate lorsque le substrat a pivoté. Son énergie d'interaction avec l'entourage est donc plus élevée dans le modèle E + S₀. La différence d'énergie potentielle totale de ce résidu devient alors globalement positive.
- L'aspartate 168 a une énergie d'interaction moins élevée avec le substrat dans le modèle E + S₁₈₀. La différence négative d'énergie est due à la répulsion entre les charges négatives du substrat et du résidu 168 dans le modèle E + S₀.
- L'arginine 171 ne réalise plus de ponts H avec le carboxyle du pyruvate lors de la rotation de ce dernier, ce qui augmente considérablement leur énergie d'interaction (différence largement positive). Par contre l'éloignement de l'arginine 171 par rapport à l'arginine 109 entraîne une différence d'énergie totale négative pour le résidu 171 (due à une énergie de répulsion plus faible).
- L'arginine 173, la sérine 199, les lysines 243 et 316 interagissent différemment avec plusieurs molécules d'eau constitutives dans le modèle natif, ce qui provoque une différence d'énergie totale positive.
- L'histidine 195 possède une énergie d'interaction avec le substrat plus élevée lorsque ce dernier a subi une rotation de 180°.

Différence d'énergie d'interaction par résidu
proche du site actif : $(E + S_{180}) - (E + S_0)$

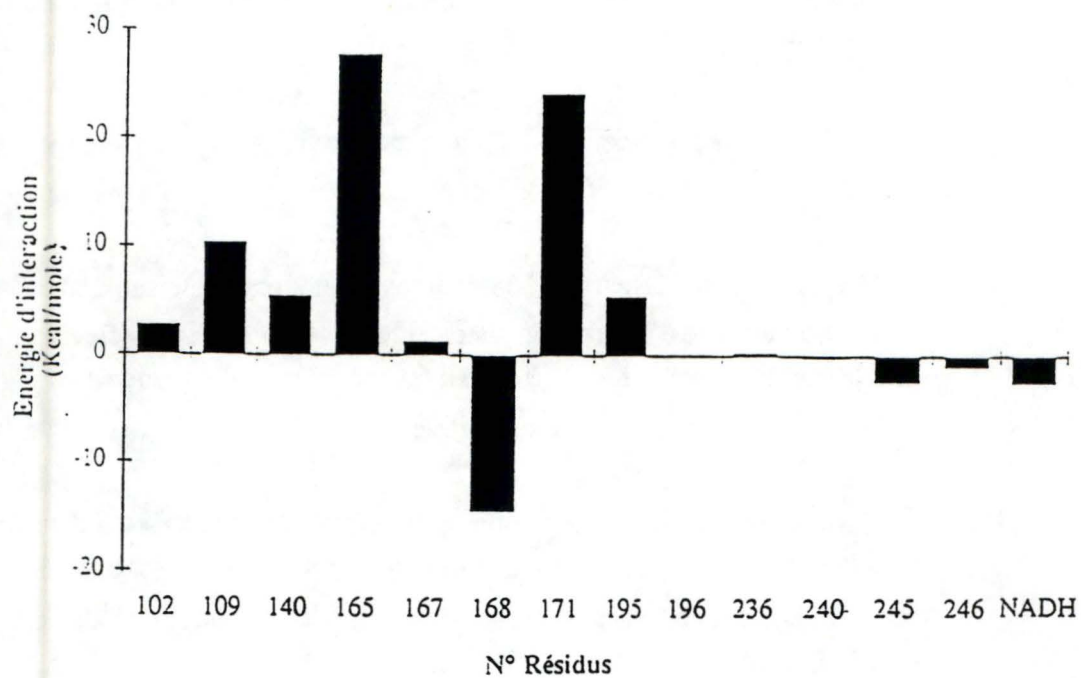
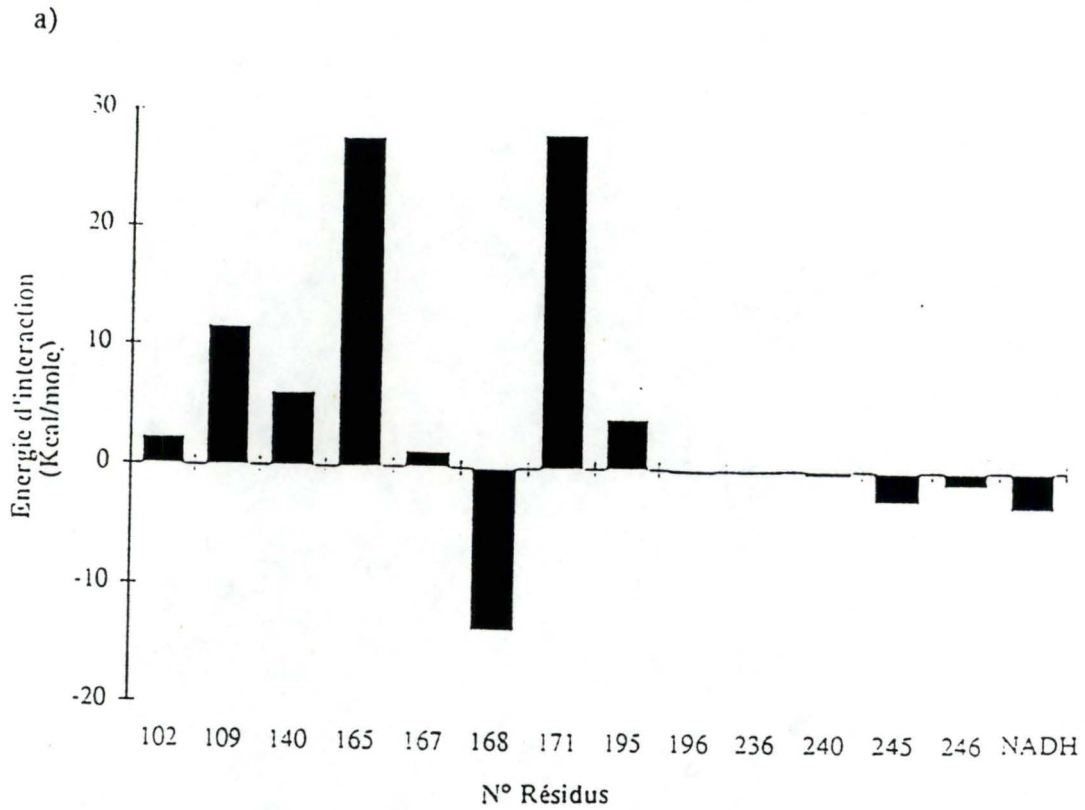


Figure 27

Différence d'énergie d'interaction par résidu proche du site actif avec le pyruvate entre les modèles $E + S_{180}$ et $E + S_0$.

Différence d'énergie d'interaction de Coulomb par résidu : $(E + S_{180}) - (E + S_0)$



Différence d'énergie d'interaction de Van Der Waals par résidu : $(E + S_{180}) - (E + S_0)$

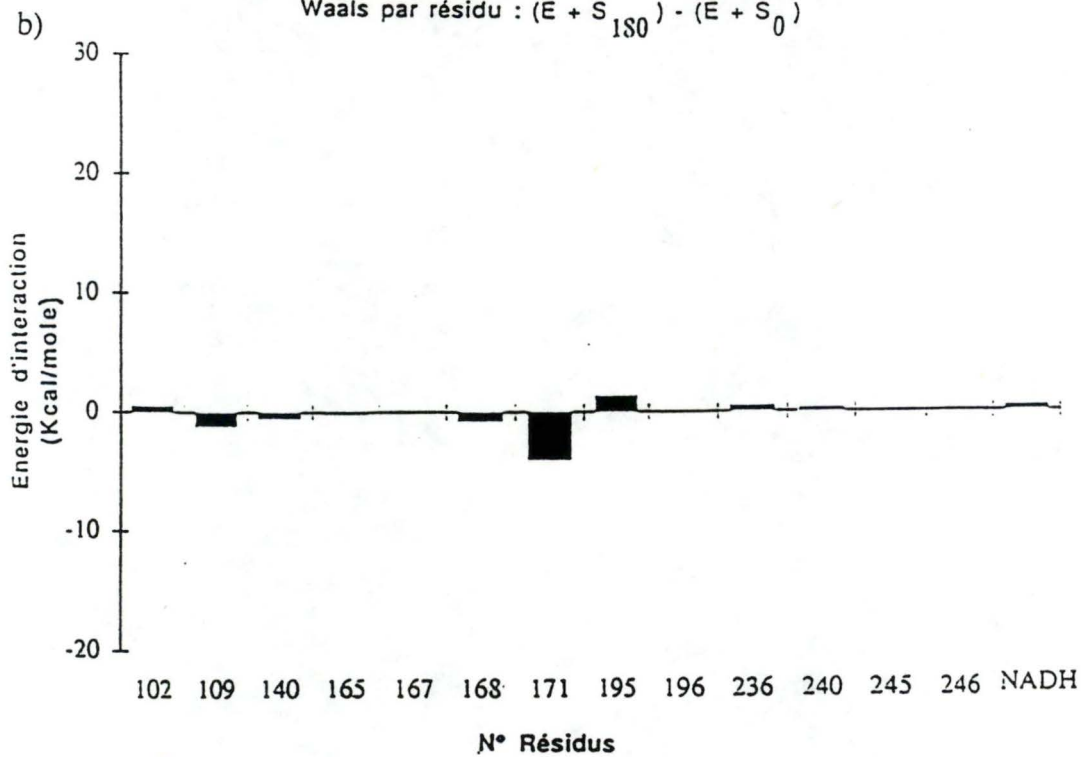


Figure 28

a) Différence d'énergie d'interaction électrostatique par résidu avec le pyruvate proche du site actif entre les modèles $E + S_{180}$ et $E + S_0$.

b) Différence d'énergie d'interaction de VDW par résidu avec le pyruvate proche du site actif entre les modèles $E + S_{180}$ et $E + S_0$.

- les résidus possédant une différence d'énergie potentielle différente de zéro se situent à proximité du substrat, ce qui est logique (voir figure 27).
- les différences d'énergie d'interaction sont essentiellement dues aux interactions électrostatiques entre résidus (voir figure 28).

La majorité des différences d'énergies potentielles sont positives. La conséquence de ce phénomène est que la rotation de 180° du pyruvate provoque une augmentation de l'énergie potentielle globale d'environ 30 Kcal/mole, ce qui est en accord avec le fait que l'enzyme à l'état natif ne peut produire du D-lactate.

III.3 Modélisation des enzymes modifiées

Afin de modifier la stéréospécificité de l'enzyme, des remplacements, choisis en fonction des résultats obtenus précédemment, ont été introduits dans le modèle de départ. Après minimisation de l'énergie potentielle, deux nouveaux modèles, l'un dans lequel la position du pyruvate est inchangée et l'autre où le substrat a subi une rotation de 180°, ont été ainsi créés.

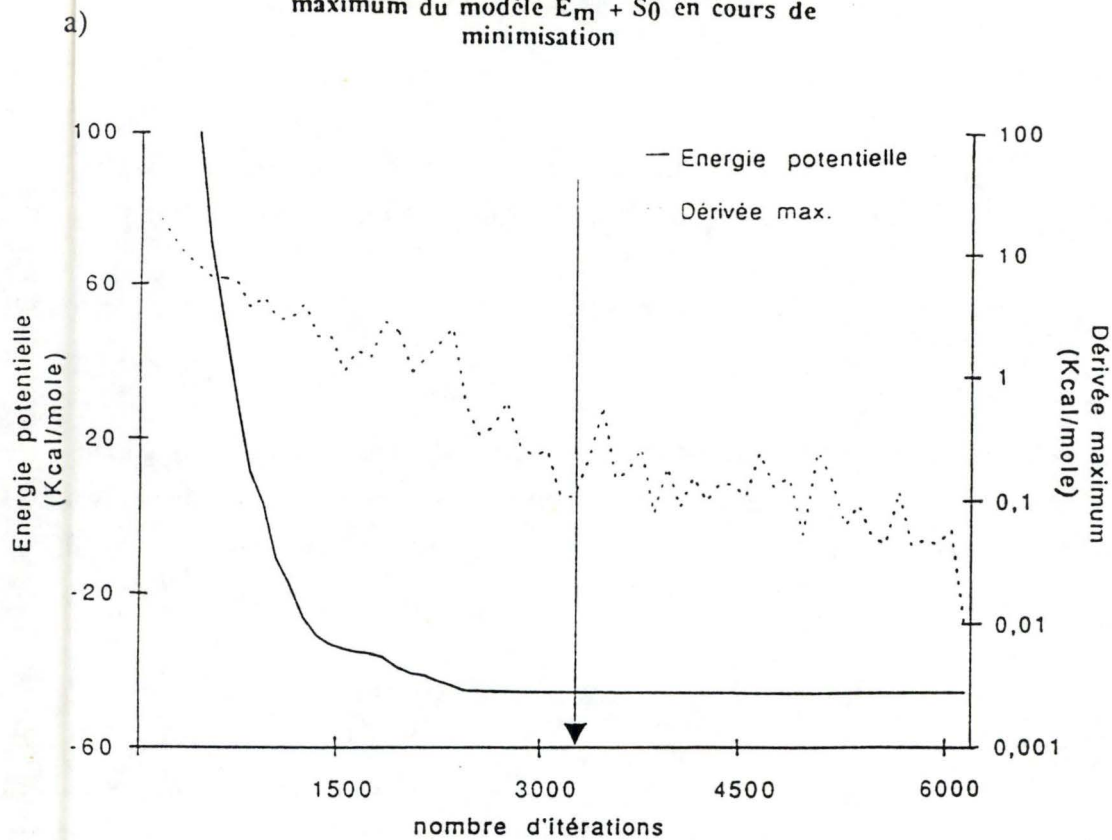
Le remplacement de certains résidus du site actif transforme, en général, les propriétés catalytiques de l'enzyme. Mais quels sont les remplacements susceptibles de modifier la stéréospécificité de l'enzyme?

III.3.1 Remplacements de deux résidus

Plusieurs informations peuvent être tirées de la comparaison énergétique des deux modèles précédents :

- **L'arginine 171** est un résidu essentiel du site actif. Il fixe le pyruvate dans la position nécessaire pour que l'enzyme puisse le transformer en L-lactate (Hart *et al*, 1987 A et B). Lors de la rotation du substrat, l'absence de ponts H entre l'arginine et le carboxyle du pyruvate, ainsi que le contact direct entre une partie hydrophile (l'arginine) et un élément hydrophobe (le méthyle du pyruvate), provoquent une augmentation importante de leur énergie d'interaction. Il est donc essentiel de remplacer le résidu 171. Afin de mettre en contact direct deux éléments hydrophobes lors du retournement du pyruvate, l'arginine a été remplacée par une isoleucine, l'un des résidus les plus hydrophobes.

Variation de l'énergie potentielle et de la dérivée maximum du modèle $E_m + S_0$ en cours de minimisation



Variation de l'énergie potentielle et de la dérivée maximum du modèle $E_m + S_{180}$ en cours de minimisation

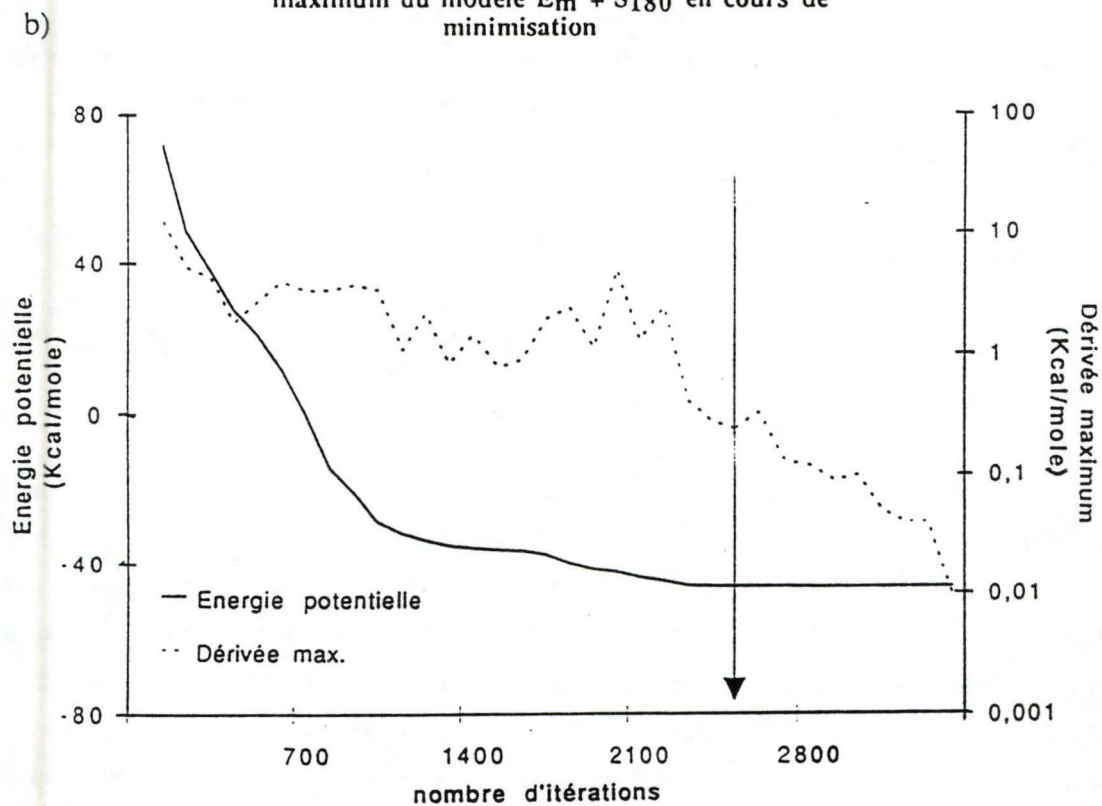
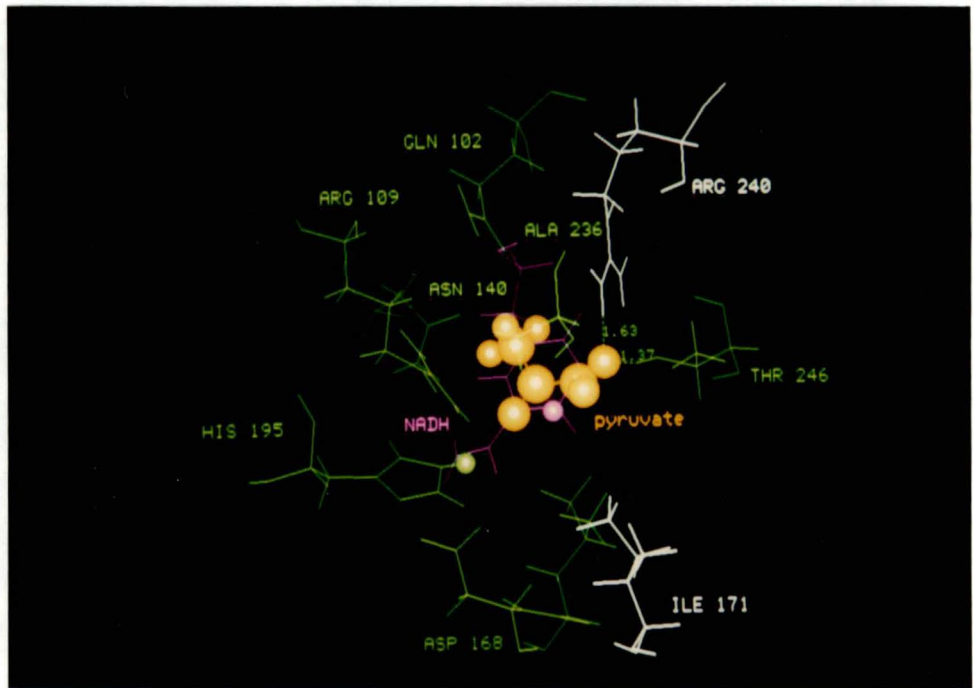


Figure 29

- a) Evolution de l'énergie potentielle du site actif et de la dérivée maximum d'énergie potentielle du modèle $E_m + S_0$ lors de la minimisation d'énergie.
- b) Evolution de l'énergie potentielle du site actif et de la dérivée maximum d'énergie potentielle du modèle $E_m + S_{180}$ lors de la minimisation d'énergie.

a)



b)

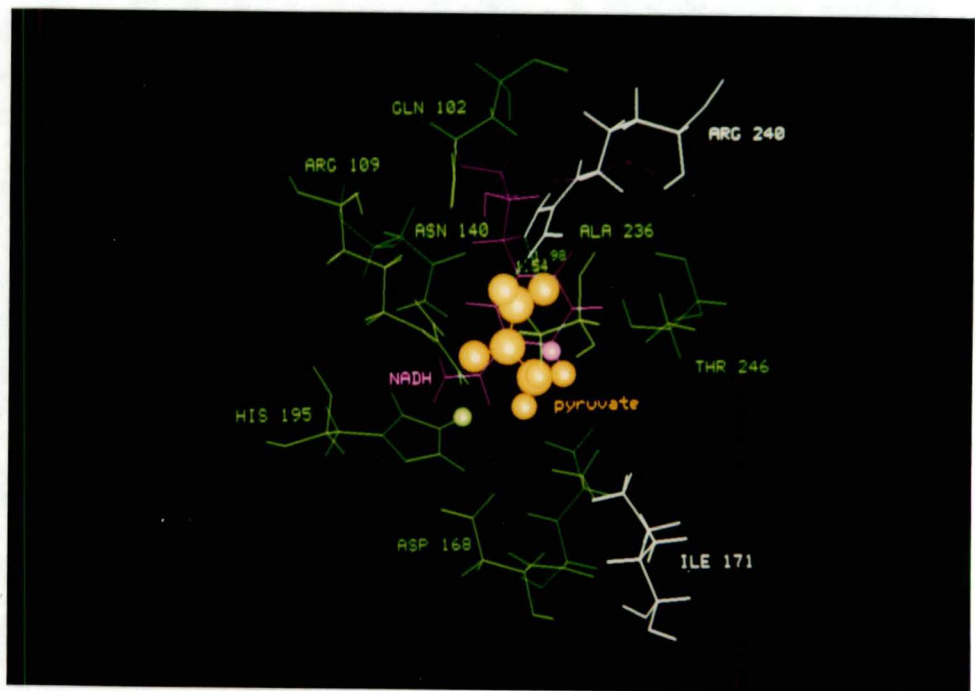


Figure 30

a) Représentation du site actif du modèle minimisé $E_m + S_0$.

b) Représentation du site actif du modèle minimisé $E_m + S_{180}$.

Le substrat est en orange, le NADH en mauve, les résidus qui seront remplacés en blanc et les autres en vert. Les ponts hydrogènes liant le carboxyle du pyruvate sont présents. L'hydrogène du NADH responsable de l'attaque nucléophile est représenté par une sphère mauve. L'hydrogène de l'histidine 195 responsable de la délocalisation de la double liaison de carbonyle du pyruvate est représenté par une sphère verte.

- La présence d'une arginine pour fixer le pyruvate dans le site actif semble être nécessaire pour le bon fonctionnement de l'enzyme (Clarke *et al.*, 1989). C'est pourquoi nous avons placé une arginine dans la région de reconnaissance du substrat qui, lorsque le pyruvate est retourné, est proche du carboxyle. Un des résidus susceptible d'être un bon candidat pour ce type de remplacement est l'**isoleucine 240**.

Un double remplacement a donc été effectué sur le modèle de départ : l'arginine 171 remplacée par une isoleucine (**R171I**) et l'isoleucine 240 par une arginine (**I240R**). Les modélisations de deux nouvelles enzymes, modifiées et chacune avec leur substrat (S0 et S180), ont ensuite permis d'analyser les effets provoqués par les remplacements

III.3.2 Les modélisations

Comme précédemment, les modèles ont été réalisés par minimisation d'énergie des seuls résidus compris dans une sphère de 15 Å de diamètre, centrée sur le site actif. Au début de la minimisation, la distance entre l'oxygène du carbonyle du pyruvate et l'hydrogène de l'histidine195, est maintenue à une valeur de 2,5 Å.

Les évolutions de l'énergie potentielle du site actif et de la dérivée maximum de cette énergie lors de la minimisation d'énergie, se trouvent à la figure 29 (la flèche montre le moment où la contrainte a été supprimée).

En fin de minimisation, l'énergie potentielle ne se modifie plus que très faiblement, mais la dérivée maximum diminue et atteint une valeur inférieure à 0,01 Kcal/mole.Å, ce qui semble indiquer que le minimum d'énergie est approximativement atteint.

III.3.3 Comparaison structurelle des deux sites actifs modifiés

La figure 30 montre les sites actifs des deux modèles, $E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$, après minimisation d'énergie. Plusieurs éléments restent identiques, alors que d'autres varient :

- Les éléments identiques sont les suivants :
 - L'hydrogène réactionnel du coenzyme se trouve à 2,7 Å du carbone du carbonyle du substrat.
 - La leucine 167, résidu hydrophobe, semble interagir de manière hydrophobe avec le noyau nicotinamide du NADH.

- Le éléments différents sont les suivants :

- le carboxyle du pyruvate est maintenu par différents ponts H :

Table 4

Em + S0		Em + S180	
Atomes et résidus impliqués	distance	Atomes et résidus impliqués	distance
l'hydrogène HH11 de l'arginine 240 et l'oxygène O2 du carboxyle du pyruvate	1,6 Å	l'hydrogène HH11 de l'arginine 240 et l'oxygène O2 du carboxyle du pyruvate	1,5 Å
l'hydrogène HG1 de la thréonine 246 et l'oxygène O2 du carboxyle du pyruvate	1,5 Å	l'hydrogène HH21 de l'arginine 240 et l'oxygène O1 du carboxyle du pyruvate	2,0 Å

- En outre, d'autres ponts H conservés possèdent des distances modifiées :

Table 5

	Em + S0	Em + S180
L'arg 109 stabilise le carboxyle du substrat par un pont H d'une longueur de :	2,0 Å	1,8 Å
L'hydrogène de l'his 195 est séparé de l'oxygène du carbonyle du pyruvate par une distance de :	2,8 Å	2,4 Å
L'aspartate 168 interagit avec l'his 195 à l'aide d'un pont H dont la distance entre atomes lourds vaut :	3,3 Å	3,5 Å

- De plus, d'autres résidus interagissent avec le substrat. L'isoleucine 171 interagit avec le méthyle du substrat dans le modèle Em + S180.

La glutamine 102, l'asparagine 140, l'alanine 236 forment une poche autour du méthyl du pyruvate dans le modèle Em + S0. De même, ils forment une poche autour du carboxyle du pyruvate dans Em + S180.

Comme nous pouvons le constater, l'énergie potentielle totale de l'enzyme modifiée ($E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$) est plus élevée que l'énergie de la protéine native ($E + S_0$), ce qui semble bien montrer que le remplacement de résidus dans une enzyme provoque une augmentation de son énergie. Il est donc possible de modifier une enzyme mais difficile d'en améliorer les propriétés. L'énergie plus élevée des enzymes modifiées par rapport à l'enzyme native pourrait indiquer une activité catalytique moins élevée ou une stabilité moindre. Pour information, une représentation des différentes structures secondaires sur lesquelles se situent les différents résidus du site actif du modèle $E_m + S_{180}$, se trouve en page de garde.

Une comparaison énergétique approfondie des deux modèles modifiés va permettre l'analyse des conséquences du remplacement des deux résidus du site actif.

III.3.4 Comparaison des deux modèles modifiés

$E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$ sont comparés par analyse des énergies suivantes: énergie potentielle totale, énergie potentielle totale par molécule, énergie potentielle totale par résidu, énergie d'interaction entre le substrat et l'enzyme.

III.3.4.1 Comparaison de l'énergie potentielle totale par molécule

Le tableau ci après reprend les valeurs d'énergie potentielle de l'ensemble du modèle, du site actif seul, de l'apoenzyme, du NADH et enfin du pyruvate pour les deux modèles (ainsi que les dérivées moyennes et maximum).

<u>Table 6</u>	Energie potentielle (Kcal/ mole)	
	$E_m + S_0$	$E_m + S_{180}$
MOLECULE		
modèle complet	2307,93	2307,3
site actif	-45,67	-46,19
enzyme	2814,64	2803,89
NADH	-61,11	-54,63
pyruvate	-30,27	-28,37

Variation de la dérivé moyenne des modèles $E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$ en cours de minimisation

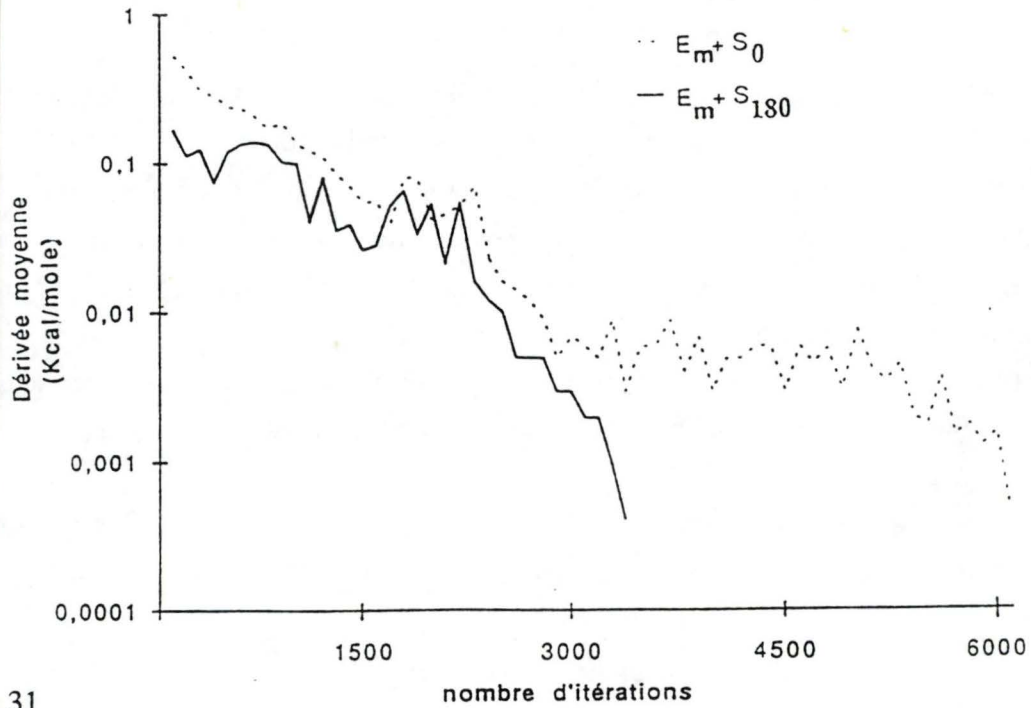


Figure 31

Comparaison de la dérivée moyenne d'énergie potentielle des modèles $E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$ lors de la minimisation d'énergie.

Variation de l'énergie potentielle des modèles $E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$ en cours de minimisation

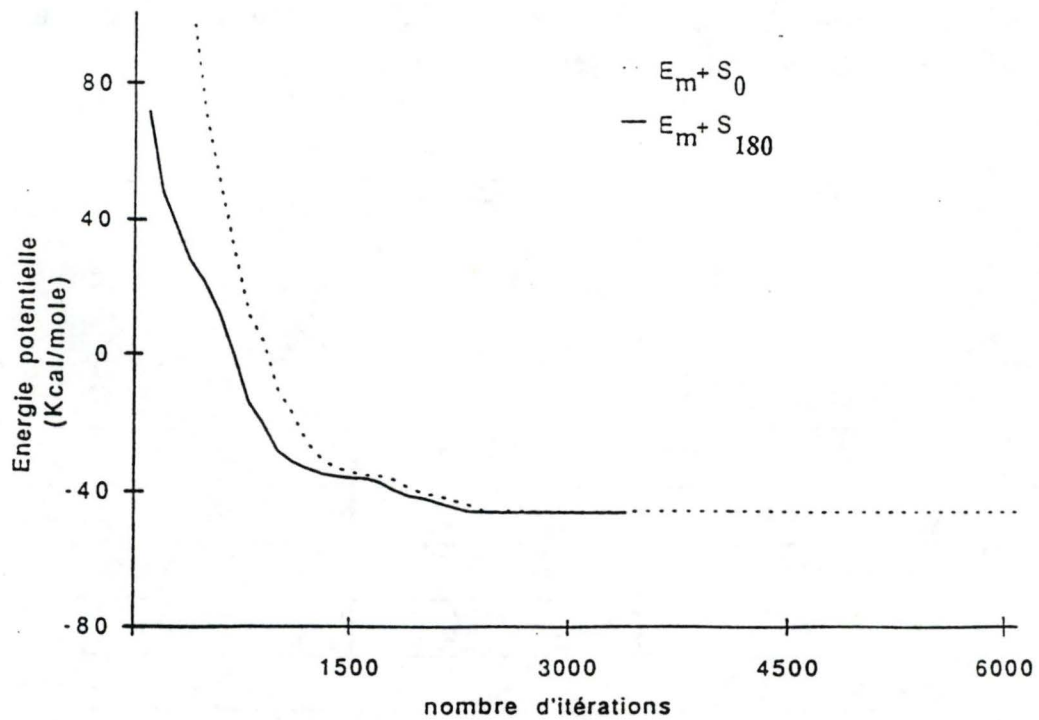
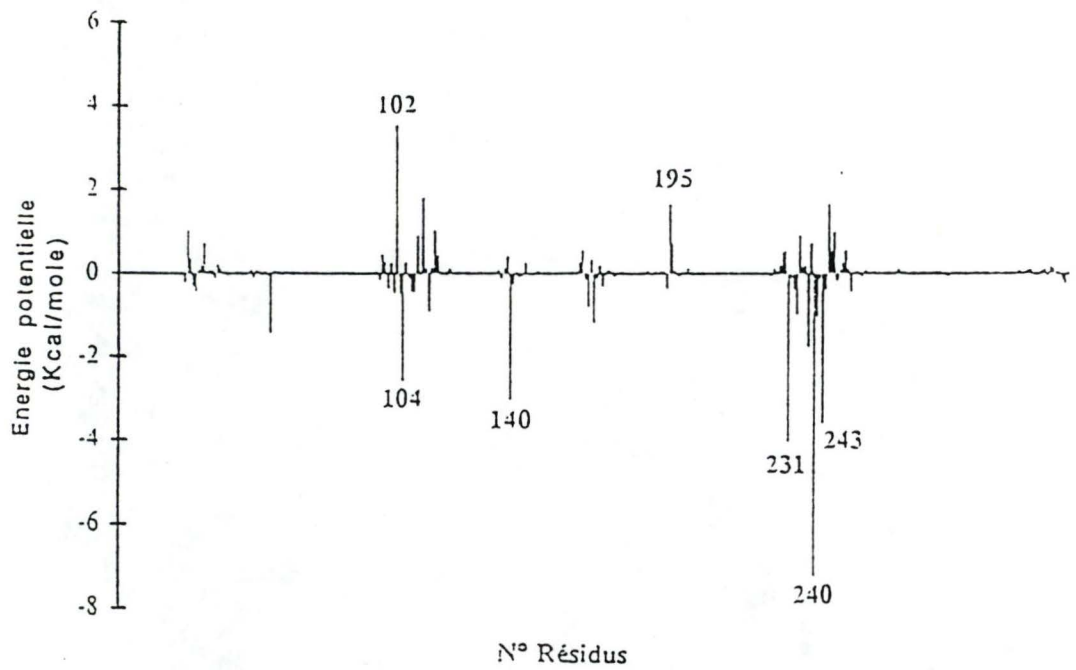


Figure 32

Comparaison de l'énergie potentielle des modèles $E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$ lors de la minimisation d'énergie.

Différence d'énergie potentielle par résidu : $(E_m + S_{180}) - (E_m + S_0)$

a)



Différence d'énergie d'interaction avec le pyruvate par résidu : $(E_m + S_{180}) - (E_m + S_0)$

b)

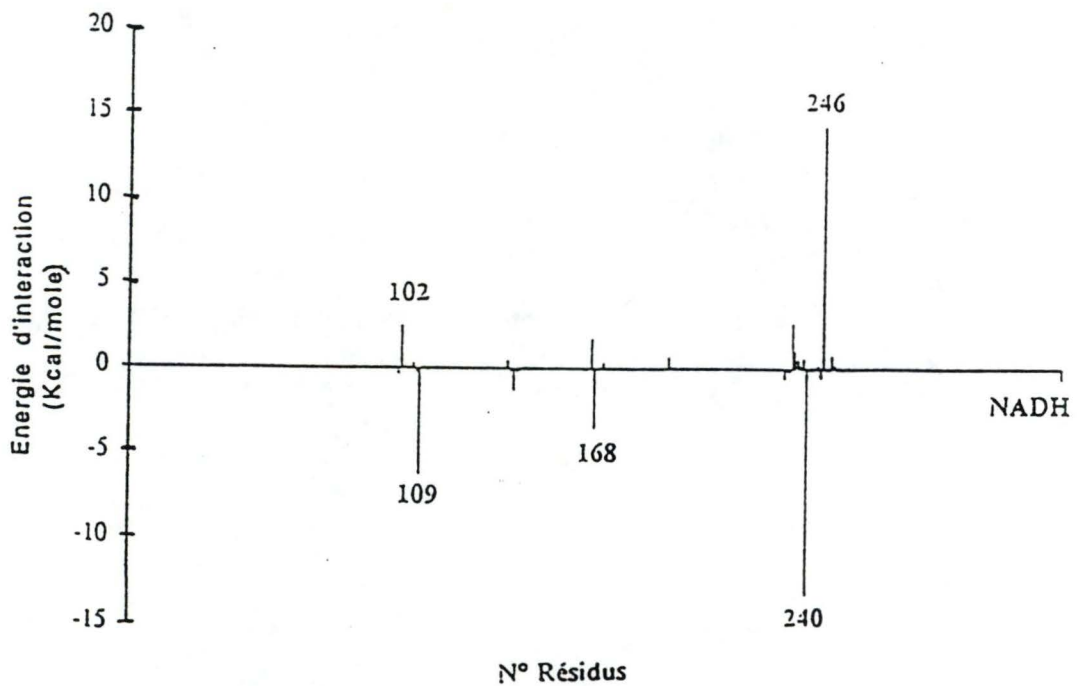


Figure 33

- a) Différence d'énergie potentielle entre les modèles $E_m + S_{180}$ et $E_m + S_0$ par résidu.
 b) Différence d'énergie d'interaction avec le pyruvate entre les modèles $E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$ par résidu.

Différence d'énergie d'interaction par résidu proche du site actif : $(E_m + S_{180}) - (E_m + S_0)$

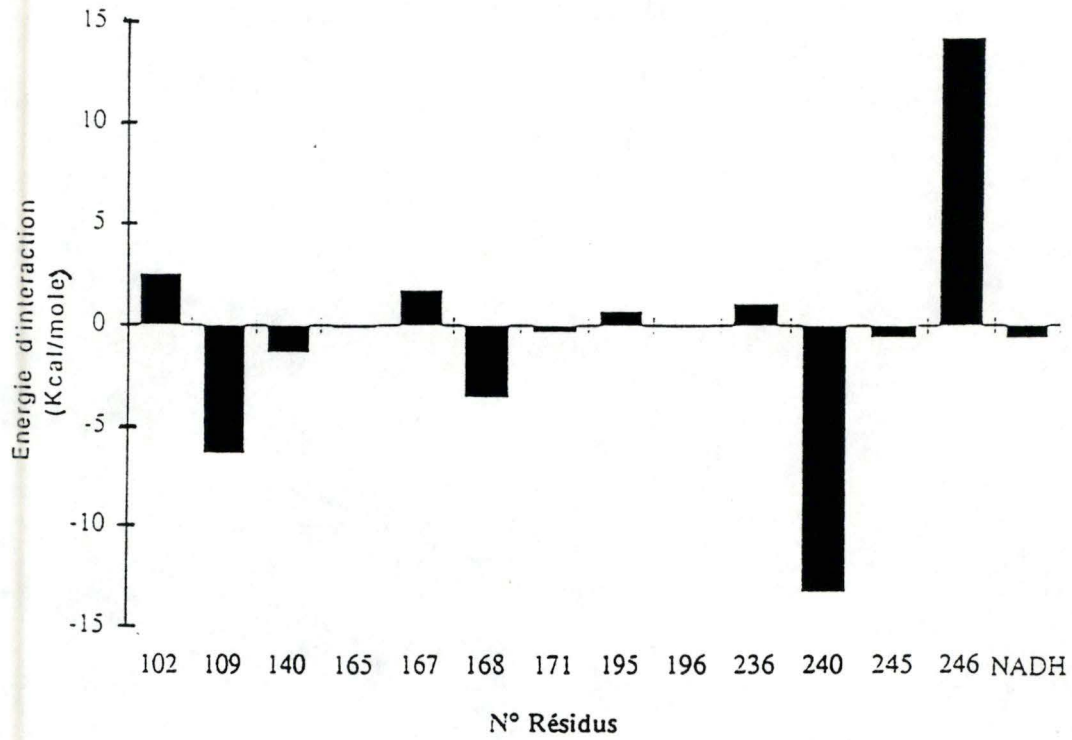


Figure 34

Différence d'énergie d'interaction avec le pyruvate entre les modèles $E_m + S_{180}$ et $E_m + S_0$ par résidu proche du site actif.

DERIVEE (Kcal/mole.Å)	$E_m + S_0$	$E_m + S_{180}$
Dér. max.	0,0056	0,0082
Dér. moy.	0,0004	0,0004

Les deux modèles se situent à un stade comparable de la minimisation (la dérivée moyenne de l'énergie potentielle est identique, voir figure 31).

Les observations suivantes peuvent être réalisées :

- Les énergies potentielles des modèles $E_m + S_{180}$ et $E + S_0$ et de leur site actif sont comparables (voir figure 32).
- L'énergie potentielle de l'enzyme seule est supérieur de 10 Kcal/mole dans $E_m + S_0$.
- L'énergie potentielle du pyruvate augmente de 2 Kcal/mole lors du passage de $E_m + S_{180}$ à $E_m + S_0$.
- L'énergie potentielle du coenzyme augmente de 6 Kcal/mole dans $E_m + S_{180}$.

La différence entre les énergies totales des deux modèles n'est pas significative. Les deux conformations sont, globalement, énergétiquement identiques. Par contre, les résidus du site actif possèdent une énergie plus faible dans $E_m + S_{180}$.

Au contraire, les énergies potentielles du coenzyme, et du pyruvate dans une moindre mesure, augmentent dans les mêmes conditions. Afin de trouver les explications de ces phénomènes, une analyse au niveau de l'énergie par résidu est effectuée.

III.3.4.2 Comparaison de l'énergie potentielle par résidu

Nous avons comparé les énergies potentielles totales par résidu des deux modèles ainsi que les énergies d'interaction avec le substrat.

Les différences d'énergies totales par résidu et les différences d'énergies d'interaction avec le pyruvate entre $E_m + S_{180}$ et $E_m + S_0$ se trouvent à la figure 33 et 34.

Les informations suivantes peuvent être tirées de ces résultats :

- La glutamine 102 possède une énergie d'interaction plus élevée avec le pyruvate dans le modèle $E_m + S_{180}$.
- Le glutamate 104 a une énergie potentielle totale inférieure dans $E_m + S_{180}$. Cette différence est due à l'apparition d'un pont H avec une molécule d'eau constitutive.

- L'arginine 109 possède une énergie d'interaction plus faible avec le pyruvate dans $E_m + S_{180}$. L'énergie d'interaction entre les arginines 109 et 171 est par contre plus élevée. Ces deux énergies d'interaction se compensant, l'énergie potentielle totale de l'arginine 109 est quasiment identique dans les deux modèles.
- L'asparagine 140 possède une énergie potentielle totale plus faible dans $E_m + S_{180}$. Ce phénomène est principalement dû au rapprochement de l'asparagine 140 de l'arginine 240.
- L'aspartate 168 a une énergie d'interaction plus élevée avec le substrat dans $E_m + S_{180}$, due à la répulsion entre les charges négatives du substrat et du résidu 168.
- L'histidine 195 possède une énergie d'interaction plus élevée avec le résidu 168 dans $E_m + S_{180}$, probablement à cause du remaniement structural interne dû au remplacement.
- La glutamine 231 établit un pont H avec une molécule d'eau constitutive dans le modèle $E_m + S_{180}$.
- L'arginine 240 établit deux ponts H avec le substrat dans $E_m + S_{180}$ (c'est-à-dire un de plus qu'avant la rotation du substrat). C'est pourquoi l'énergie d'interaction et l'énergie totale du résidu 240 sont largement plus élevées dans le modèle $E_m + S_0$.
- La lysine 243 établit un pont H avec une molécule d'eau constitutive dans le modèle $E_m + S_{180}$.
- La thréonine 246 établit un pont H avec le carboxyle du pyruvate dans le modèle $E_m + S_0$. L'énergie d'interaction entre ce résidu et le substrat est donc moins élevée. Dans l'autre modèle, le même résidu établit un pont H avec une molécule d'eau constitutive, ce qui explique une différence d'énergie totale quasiment nulle pour le résidu 246.

Energie d'interaction entre le pyruvate et les résidus remplacés

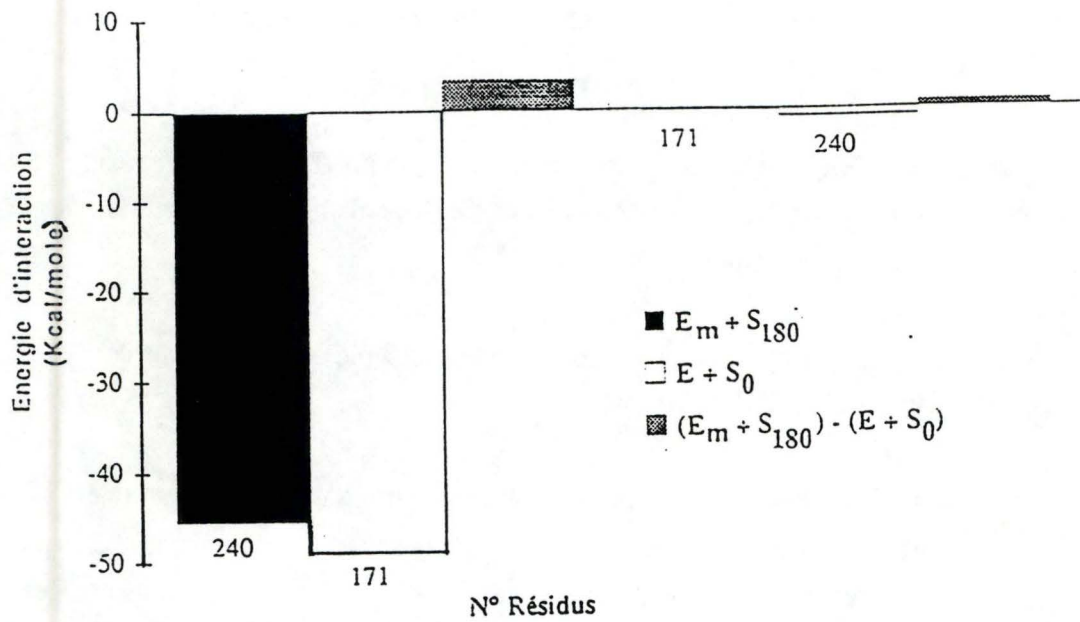
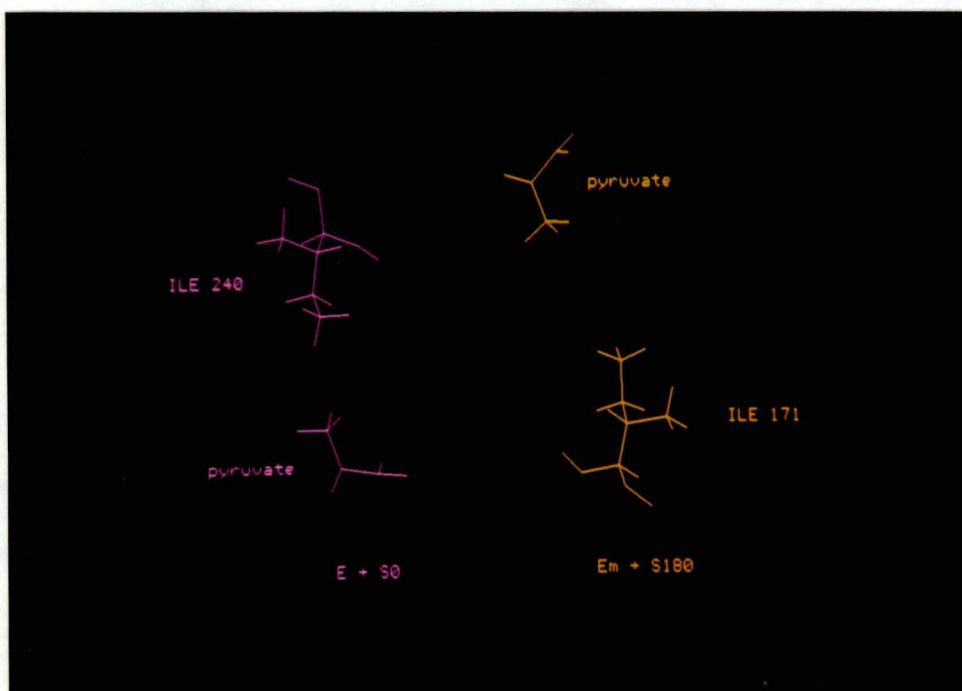


Figure 35

Energie d'interaction entre le pyruvate et les résidus remplacés dans les modèles $E + S_0$ (en blanc) et $E_m + S_{180}$ (en noir). La différence d'énergie d'interaction entre le substrat et l'arginine dans les modèles $E_m + S_{180}$ et $E + S_0$ se trouve en gris pointillé. La différence d'énergie d'interaction entre le substrat et l'isoleucine dans les deux modèles $E_m + S_{180}$ et $E + S_0$ est représentée de la même manière.

a)



b)

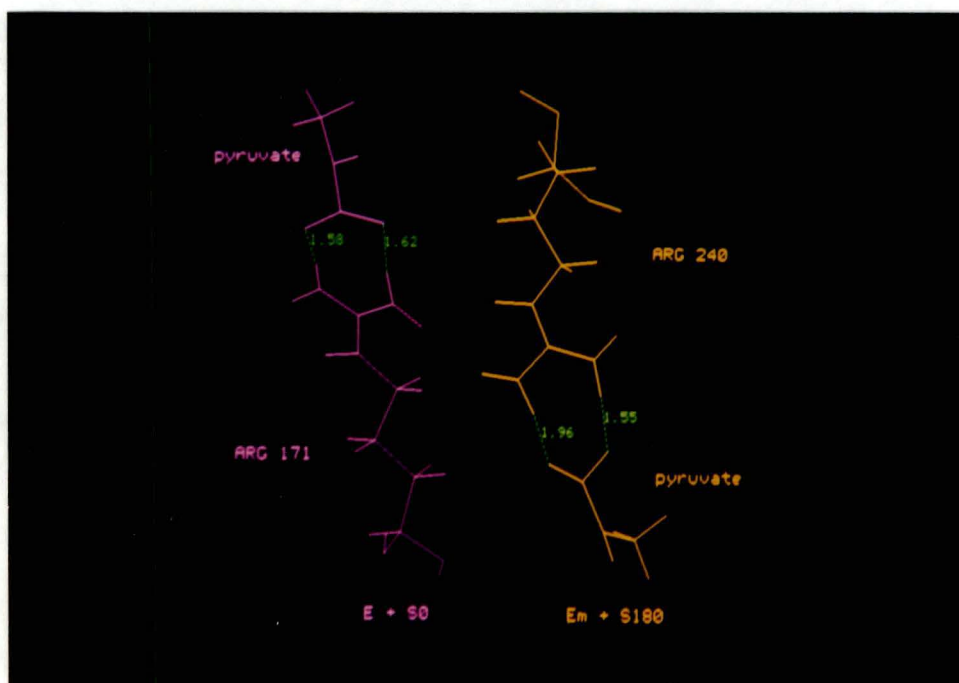


Figure 36

Représentation structurale de l'interaction entre les résidus remplacés et le pyruvate dans les modèles Em + S180 et E + S0. l'isoleucine se trouve en a, l'arginine en b.

La majorité des différences d'énergie potentielle des résidus de la protéine sont négatives. Malheureusement, le coenzyme possède une énergie plus importante dans les mêmes conditions. Ces deux phénomènes font que l'énergie potentielle totale est identique dans les deux modèles.

III.4 Comparaison des résidus remplacés

Une comparaison a été effectuée au niveau de la structure et de l'énergie d'interaction avec le pyruvate pour les deux résidus remplacés (figure 35 et 36). Comme nous pouvons le voir, l'arginine qui interagit avec le carboxyle du pyruvate (171 dans le modèle E + S₀ et 240 dans le modèle Em + S₁₈₀) possède une énergie d'interaction comparable dans les deux modèles; respectivement -49 et -46 Kcal/mole. Le substrat semble donc être aussi bien fixé par l'arginine dans le site actif des deux modèles. L'isoleucine, quant à elle, n'interagit que très peu avec le pyruvate aussi bien dans un cas comme dans l'autre (-0,2 pour l'isoleucine 171 du modèle Em + S₁₈₀, et -0,9 pour l'isoleucine 240 de E + S₀).

Plusieurs autres remplacements ont été testés dans le même but avec plus ou moins de succès :

- La glutamine 102, qui se situe dans la poche de reconnaissance du substrat dans l'enzyme native, a été remplacée par une arginine. Malheureusement l'arginine interagit alors beaucoup moins favorablement avec le pyruvate ayant subi une rotation de 180° (l'énergie d'interaction de l'arginine avec le substrat étant plus élevée que dans Em + S₁₈₀).

- l'arginine 171 à été remplacée par plusieurs résidus hydrophobes de différentes tailles : phénylalanine, tryptophane, tyrosine, leucine, valine. Les résultats obtenus sont tous équivalents à ceux obtenus avec l'isoleucine.

III.5 Vérification des modèles par dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire à été appliquée aux quatre modèles, en se limitant aux résidus proches du site actif, comme lors des minimisations d'énergie précédentes. La simulation se déroule sur 3,5 picosecondes à une température constante de 500° K.

La dynamique moléculaire a été appliquée simulée pour deux raisons :

- Elle permet d'atteindre les minima d'énergie qui se situent aux alentours du minimum (obtenu par minimisation). Il serait donc possible d'obtenir la conformation correspondant au minimum global si ce dernier se situe auprès du minimum atteint par la minimisation.

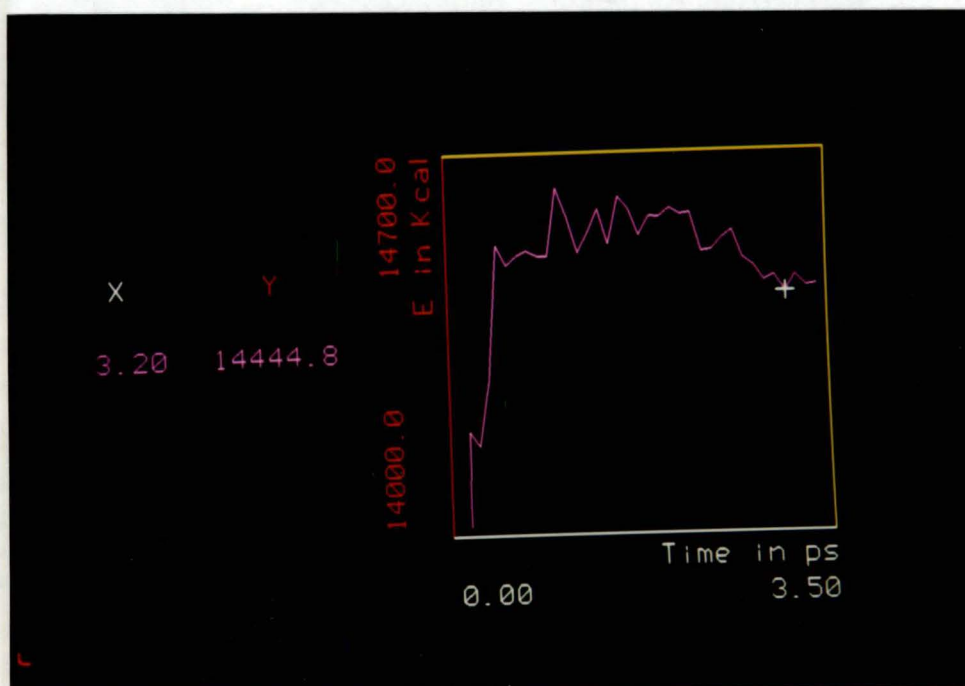


Figure 37

Evolution de l'énergie totale du site actif du modèle E + S180 lors de la dynamique moléculaire. La première partie du graphe représente l'initialisation de la simulation, c'est-à-dire la montée progressive de la température (et donc de l'énergie totale) jusqu'à l'obtention du niveau souhaité (ici 500° K). La suite du graphique représente l'évolution de l'énergie totale du site actif durant la dynamique moléculaire proprement dite, c'est-à-dire l'évolution de l'énergie totale suivant les conformations prises par le site actif durant la simulation. L'astérisque représente la conformation correspondant au minimum global d'énergie totale lors de la dynamique moléculaire proprement dite.

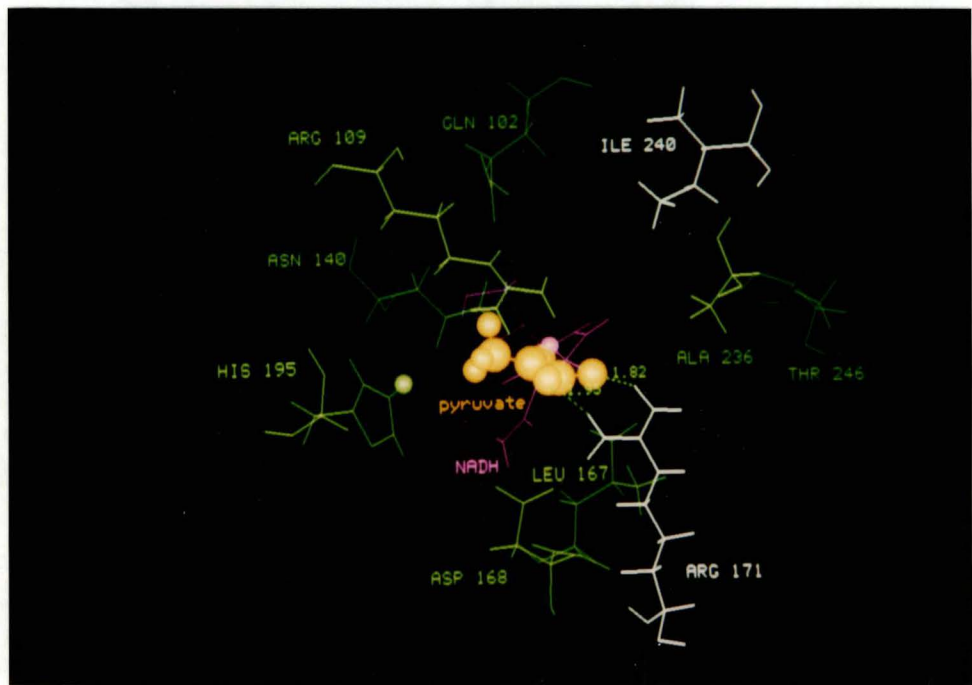


Figure 38

Représentation du site actif du modèle E + S180 dans la conformation correspondant au minimum global d'énergie totale atteint par la dynamique moléculaire.

- Elle provoque le déplacement des atomes dans les directions déterminées par les forces qu'ils subissent. Cela met en évidence la tendance que possède le système à évoluer vers une autre conformation.

III.5.1 Minimum local ou minimum global ?

Les différentes conformations adoptées par les molécules lors de la dynamique moléculaire sont caractérisées par des énergies potentielle et cinétique (ou température) précises. Pour rappel, lorsque la température reste constante, l'énergie cinétique le reste également; la conformation correspondant au minimum d'énergie potentielle possède alors une énergie totale minimale (voir chapitre I.3.5).

Comme nous pouvons le voir à la figure 37, toutes ces valeurs d'énergies sont disponibles à tout moment lors de la simulation. Pour chacun des modèles obtenus précédemment, la minimisation de l'énergie de la conformation, correspondant au minimum d'énergie le plus important, nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- En ce qui concerne $E + S_0$, $E_m + S_0$ et $E_m + S_{180}$, le modèle final obtenu est identique au modèle de départ. Les énergies potentielles totales et les énergies d'interaction avec le substrat pour chaque résidu sont identiques, l'énergie globale de l'enzyme l'est également. Finalement, la structure du site actif est identique.

Ces résultats sont dus : - soit au fait que le minimum atteint par la minimisation d'énergie seule est bien le minimum global de la fonction énergie potentielle.

- soit au fait que le minimum global se trouve trop loin du point de départ, et la dynamique moléculaire n'a pas permis de l'atteindre. Il faudrait alors effectuer une simulation plus longue pour tenter d'atteindre ce minimum global .

- En ce qui concerne $E + S_{180}$ (voir figure 38), nous obtenons une conformation intermédiaire entre $E + S_{180}$ et $E + S_0$ (l'énergie totale du modèle se situe entre les énergies de ces deux modèles). Le substrat, ayant préalablement subi une rotation de 180° , s'est retourné lors de la dynamique moléculaire et a, de cette manière, créé deux ponts H avec l'arginine 171. Cette position plus favorable énergétiquement pour le substrat et quelques résidus du site actif, entraîne une diminution de l'énergie potentielle de l'enzyme. Malheureusement, le carbonyle du pyruvate est dirigé vers une direction opposée à l'histidine 195, ce qui interdit toute réaction catalytique.

Le fait qu'il existe des conformations intermédiaires plus favorables énergétiquement mais ne permettant pas de réaction, pourrait expliquer l'absence de productivité de D-lactate par l'enzyme native.

Il est bon de remarquer que cette conformation correspondant au minimum global d'énergie totale atteint par la dynamique moléculaire, se situe en fin de simulation, alors que les minima globaux d'énergie des autres dynamiques moléculaires se situent plutôt en début de simulation. La conformation native (E + S₀) n'a pas été atteinte par la dynamique moléculaire, ce qui semble indiquer que le temps de simulation n'était pas suffisant.

III.5.2 Tendances du substrat dans les différents sites actifs

Durant la dynamique moléculaire, un atome se déplace dans la direction déterminée par la somme des forces qu'il subit. Il est possible de cette manière de percevoir la tendance que possède le système à évoluer vers une autre conformation.

Les observations réalisées sont les suivantes :

- Dans le modèle natif (E + S₀) et les deux modèles modifiés (E_m + S₀ et E_m + S₁₈₀), le substrat a tendance à se maintenir dans sa position de départ. Il semble bien tenu en place par les résidus qui l'entourent, en particulier par les ponts H qu'il partage avec les arginines 109 et 171 (pour le modèle natif) ou 240 (pour les deux autres modèles). Ces interactions, énergétiquement favorables, semblent être trop importantes que pour pouvoir être éliminées sans augmenter l'énergie potentielle du modèle.

- Dans le modèle non modifié dont le substrat a subi une rotation de 180° (E + S₁₈₀), le carboxyle du pyruvate se déplace vers le groupement guanidium de l'arginine 171 et forme deux ponts H présents dans le modèle natif (voir figure 38). Cette interaction favorable entraîne une diminution de l'énergie totale de l'enzyme mais empêche par ailleurs toute réaction catalytique (le carbonyle du pyruvate se trouve dans une position inadéquate).

III.5.3 Conclusions

La dynamique moléculaire semble d'une part nous indiquer que les modèles E + S0, Em + S0 et Em + S180 semblent correspondre au minimum global d'énergie (du moins dans les conformations explorées par la simulation). D'autre part, elle semble nous indiquer que la production de D-lactate par l'enzyme native (du moins de la manière dont il est proposé) est énergétiquement improbable.

En outre, il apparaît que les modifications apportées au modèle semblent transformer la L-LDH en une LDH non stéréospécifique. Si c'est le cas, l'enzyme modifiée pourrait transformer indifféremment le pyruvate en L- ou D-lactate, dans la mesure où la protéine mutante est active et stable.

IV PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

L'élaboration d'un modèle tridimensionnel de la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin a permis de mettre en relation la structure et la fonction de l'enzyme (Vinals, non publié). Ainsi, il est devenu possible d'émettre une hypothèse sur la cause de la stéréospécificité de la protéine (c'est-à-dire la formation exclusive de L-lactate) et le rôle de chaque résidu du site actif dans le phénomène catalytique. Grâce aux différentes techniques de modélisation, nous nous sommes efforcés de déterminer les remplacements de résidus du site actif qui permettraient à l'enzyme de produire du D-lactate. L'attaque nucléophile du carbone du carbonyle du pyruvate par l'ion hydrure du coenzyme se réalisant toujours dans le même sens, le pyruvate, lorsqu'il a subi une rotation de 180° autour de l'axe C-O du carbonyle, provoque la formation de l'autre stéréoisomère du lactate. L'étude approfondie de la structure du site actif et des paramètres énergétiques de tous ses résidus, nous a permis de proposer les modifications susceptibles de provoquer la rotation spontanée du substrat dont la conséquence serait le changement de stéréospécificité. Finalement, le double remplacement suivant nous a semblé le plus adéquat : l'arginine 171 remplacée par une isoleucine (R171I) et l'isoleucine 240 par une arginine (I240R). Les effets des modifications sur la structure et l'énergie de l'enzyme, ont été modélisés par minimisation d'énergie et vérifiés par dynamique moléculaire. Selon les résultats théoriques obtenus, une hypothèse possible serait que l'enzyme native (totalement stéréospécifique du L-lactate), serait, après mutation, transformée en une enzyme ne possédant plus aucune stéréospécificité. La L-LDH mutée (R171I, I240R) catalyserait alors la réaction suivante : Pyruvate → mélange de D- et L-lactate.

Les différents modèles obtenus ne sont que des structures énergétiquement vraisemblables. Les résultats acquis ne peuvent en aucun cas garantir le fonctionnement correct de la protéine mutée; ils nous montrent, de manière qualitative, la présence d'une activité catalytique énergétiquement plausible. D'autres phénomènes, tels que des problèmes quantitatifs d'activité et de stabilité de l'enzyme, ne peuvent être mis en évidence par les techniques actuelles de modélisation. C'est pourquoi ce travail devra être poursuivi et complété par des résultats expérimentaux.

Tout d'abord, il serait intéressant de réaliser des simulations par dynamique moléculaire sur un temps plus important (de 10 à 25 picosecondes) afin d'explorer un nombre plus élevé de conformations et donc d'augmenter les chances de détecter la conformation correspondant au minimum global d'énergie potentielle.

Une fois la modélisation complète terminée, les étapes suivantes seront l'élaboration de l'enzyme mutée par mutagenèse dirigée et la production de la L-LDH mutée (I171R, R240I) de muscle de lapin ainsi que les mesures d'activité de l'enzyme mutée en présence de L-lactate et de D-lactate.

La création, par modélisation, d'une L-LDH mutée produisant du D-lactate peut être intéressante pour plusieurs raisons. Tout d'abord, d'un point de vue fondamental, ce type d'expérience apporte des renseignements sur les phénomènes structuraux et énergétiques régissant l'activité catalytique d'une enzyme et notamment sa spécificité. En outre, elles contribuent à la mise au point de techniques de modélisation qui permettent l'obtention d'enzyme mutante de manière plus rationnelle. Ensuite, d'un point de vue appliqué, il pourrait être intéressant d'obtenir une LDH de mammifère non stéréospécifique, enzyme inexistante dans la nature. Elle pourrait fournir sans difficulté un mélange de D- et de L-lactate ou être utilisée indifféremment avec du L- ou du D-lactate pour permettre la régénération de NADH (Willemot et Durand, 1988; Chenault et Whitesides, 1989; Gu et Chang, 1990).

Les modèles tridimensionnels permettent de réaliser le lien entre la structure d'une enzyme et son activité catalytique (Weber, 1990). Ils fournissent des renseignements précieux sur le rôle que possède chaque acide aminé au sein du site actif de la protéine. En outre, ils peuvent être utilisés pour prévoir les conséquences d'éventuels remplacements d'un ou plusieurs résidus. Il devient dès lors possible de transformer la spécificité et même la fonction d'une protéine de manière beaucoup plus rationnelle que par la seule mutagenèse dirigée. La combinaison des méthodes de modélisation moléculaire et des techniques de génie génétique afin de modifier une enzyme peut être un outil très puissant. Malgré des débuts souvent encourageants et des perspectives intéressantes, beaucoup de progrès doivent être encore réalisés dans le domaine de la modélisation protéinique.

Bibliographie

Abad-Zapatero C.; Griffith J.P.; Sussman J.L.; Rossman M.G. (1987)

" Refined Crystal Structure of Dogfish M4 Apo-Lactate Dehydrogenase." *J. Mol. Biol.*, 198: 445-467

Acharya K.R.; Stuart D.I.; Phillips D.C.; Scheraga H.A. (1990)

" Acritical Evaluation of the Predicted and X-Ray Structures of α -Lactalbumin" *J. Prot. Chem.*, 9 (5) : 549-563

Adams M.J.; Ford G.C.; Koekoek R.; Lentz P.J. McPherson A.; Rossman M.G.; Smiley I.E.; Schevitz R.W.; Wonacott A.J. (1970)

" Strucutre of Lactate Dehydrogenase at 2,8 Å Resolution." *Nature*, 7(12) : 1098-1103

Adams M.J.; Liljas A.; Rossman M.G. (1973)

" Functional Anion Binding Sites in Dogfish M4 Lactate Dehydrogenase." *J. Mol. Biol.*, 76 : 519-531

Adams M.J.; Buehner M.; Chandrasekhar K.; Ford G.C.; Hackert M.L.; Liljas A.; Rossmann M.G.; Smilley I.E.; Allison W.; Everse J.; Kaplan N.O.; Taylor S.S. (1973)

" Structure-Function Relationships in Lactate dehydrogenase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 (7) : 1968-1972

Anfinsen C.B. (1973)

" Principles that govern the folding of protein chains." *Science*, 181 : 223-230

Chenault H.K; Whitesides G.M. (1989)

" Lactate Dehydrogenase-Catalyzed Regeneration of NAD from NADH for Use in Enzyme-Catalyzed Synthesis" *Bioorg. Chem.*, 17 : 400-409

Clarke A.R.; Waldman A.D.B.; Munro I.; Holbrook J.J. (1985 A)

" Changes in the State of Subunit Association of Lactate Dehydrogenase from *Bacillus Stearotherophilus*." *Biochim. Biophys. Acta*, 828 : 375-379

Clarke A.R.; Waldman A.D.B.; Hart K.W., Holbrook J.J. (1985 B)

" The Rates of Defined Changes in Protein Structure during the Catalytic Cycle of Lactate dehydrogenase." *Biochim.Biophys. Acta*, 829 : 397-407

Clarke A.R.; Wigley D.B.; Chia W.N.; Barstow D.; Atkinson T.; Holbrook J.J. (1986)

" Site-Directed Mutagenesis Reveals Role of Mobile Arginine Residue in Lactate Dehydrogenase Catalysis." *Nature*, 324 (18/25) : 699-702

Clarke A.R.; Wigley D.B.; Barstow D.A.; Chia W.N.; Atkinson T.; Holbrook J.J. (1987)

" A Single Amino Acid Substitution Deregulates a Bacterial Lactate dehydrogenase and Stabilizes its Tetrameric Structure." *Biochim.Biophys.Acta*, 913 : 72-80

Clarke A.R.; Wilks H.M.; Barstow D.A.; Atkinson T.; Chia W.N.; Holbrook J.J. (1988)

" An Investigation of the Contribution Made by the carboxylate Group of an Active Site Histidine-Aspartate Couple to Binding and Catalysis in Lactate Dehydrogenase." *Biochem.*, 27 : 1617-1622

Clarke A.R.; Atkinson T.; Holbrook J.J. (Mars 1989)

" From Analysis to Synthesis : New Ligand Binding Sites on the Lactate Dehydrogenase Framework. Part I." *TIBS*, 14 : 101- 105

Clarke A.R.; Atkinson T.; Holbrook J.J. (Avril 1989)

" From Analysis to Synthesis : New Ligand Binding Sites on the Lactae Dehydrogenase Framework. Part II." *TIBS*, 14 : 145-148

Depiereux E.; Feytmans E. (1991)

" Simultaneous and Multivariate Alignment of Protein Sequences. Correspondance Between Physicochemical Profiles and Structurally Conserved Regions (SCR)." *Prot. Engng.*, 4 (6)

" Discover." (March 1991)

Version 2.7.0 , Biosym Technologies, San Diego

Dunn C.R.; Wilks H.M.; Halsall D.J.; Atkinson T.; Clarke A.R.; Muirhead H.; Holbrook J.J. (1991)

" Design and Synthesis of New Enzymes Based on the Lactate Dehydrogenase Framework." *Phil. Trans. Roy. Soc. [B]*, 322(1263) : 177-191

- Epstein C.J.; Goldberger R.F.; Anfinsen C.B. (1963)
 " The genetic control of tertiary protein structure : Studies with model systems." Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 27 : 439-449
- Eventoff W.; Rossmann G.; Taylor S.S.; Torff H.-J.; Meyer H.; Keil W.; Kiltz H.-H. (1977)
 " Structural Adaptations of Lactate Dehydrogenase Isozymes." Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74 (7) : 2677-2681
- Fasman G.D. (1989)
 " Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation" Plenum Press, New York
- Garvie E.I. (Mars 1980)
 " Bacterial Lactate Dehydrogenases." Microbiol. Rev., 44 (1) : 106-139
- Glasfeld A.; Leanz G.F.; Benner S.A. (1990)
 " The Stereospecificities of Seven Dehydrogenases from *Acholeplasma Laidlawii*." J. Biol. Chem., 265 (20) : 11692-11699
- Glusker J.P.; Trueblood K.N. (1985)
 " Crystal Structure Analysis." 2 ème édition, Oxford University Press, Los Angeles.
- Gu K.F.; Chang T.M.S. (1990)
 " Conversion of Ammonia or Urea into Essential Amino Acids, L-Leucine, L-Valine, and L-Isoleucine Using Artificial Cells Containing an Immobilized Multienzyme System and Dextran-NAD+" Appl. Biochem. and Biotech., 26 : 115-124
- Hagler A.T.; Lifson S (1979)
 " Consistent Valence Force Field Studies of Intermolecular Forces in Hydrogen Bonded Crystals. a Benchmark for the Objective Comparison of Alternative Force Fields." J. Am. Chem. Soc., 101 : 813-819
- Hart K.W.; Clarke A.R.; Wigley D.B.; Waldman A.D.B.; Chia W.N.; Barstow D.A.; Atkinson T.; Jones J.B.; Holbrook J.J. (1987 A)
 " A Strong Carboxylate-Arginine Interaction is Important in Substrate orientation and Recognition in Lactate Dehydrogenase." Biochim. Biophys. Acta, 914 : 294-298

Hart K.W.; Clarke A.R.; Wigley D.B.; Chia W.N.; Barstow D.A.; Atkinson T.; Holbrook J.J. (1987 B)

" The Importance of Arginine 171 in Substrate Binding by *Bacillus Stearothermophilus* Lactate Dehydrogenase." Biochem. Biophys. Res. Comm., 146 (1) : 346-353

Holbrook J.J.; Liljas A.; Steindel S.J.; Rossmann M.G. (1975)

" Lactate Dehydrogenase." in The Enzymes, Boyer P.D. ed., Academic Press, New York, vol. 11, part I : 191-292

Kane J; Sternheim M. (1986)

" Physique." InterEditions, Paris

Kim M-J.; Whitesides G.M. (1988)

" L-Lactate dehydrogenase : Substrate Specificity and Use as a Catalyst in the Synthesis of Homochiral 2-Hydroxy Acids." J. Am. Chem. Soc., 110 : 2959-2964

LaReau R.D.; Anderson V.E. (1989)

" Lactate dehydrogenase Displays Absolute Stereospecificity in the Transfer of the Prochiral Hydrogen of NADH." J. Biol. chem., 264 (26) : 15338-15343

Le Bras G.; Garel J-R. (1991)

" Properties of D-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus Bulgaricus* : a Possible Evolutionary Origin for the D- and L-lactate Dehydrogenases." FEMS Microbiol. Letters, 79 : 89-94

Lehninger A.L. (1972)

"Biochimie. Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires." Flammarion Medecine-Sciences, Paris

Li S. S.-L.; Fitch W.M.; Pan Y-C.E.; Sharief F.S. (1983)

" Evolutionary Relationships of Vertebrate Lactate Dehydrogenase Isozymes A4 (Muscle), B4 (Heart), and C4 (Testis)." J. Biol. Chem., 258 (11) : 7029-7032

Mc Cammon J.A.; Harvey S. (1988)

" Dynamics of Proteins and Nucleic Acids." 2 ème édition, Cambridge University Press, Cambridge

McPherson A. Jr. (1970)

" Interaction of Lactate Dehydrogenase with its Coenzyme, Nicotinamide-Adenine Dinucléotide." *J. Mol. Biol.*, 51 : 39-46

Miller S. (1989)

" The Structure of Interface Between Subunits of Dimeric and Tetrameric Proteins." *Prot. Engng.*, 3 : 77-83

Mutter M. (1985)

" The Construction of New Proteins and Enzymes- a Prospect for the Future?" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24 : 639-653

Mutter M. (1988)

" Nature's Rules and Chemist's Tools : a Way for Creating novel Proteins." *TIBS*, 13 : 260-264

Sass C.; Briand M.; Benslimane S.; Renaud M.; Briand Y. (1989)

" Characterization of Rabbit Lactate Dehydrogenase-M and Lactate Dehydrogenase-H cDNAs. Control of Lactate dehydrogenase Expression in Rabbit Muscle." *J. Biol. Chem.*, 264 (7) : 4076-4081

Schulz G.E.; Schirmer R.H. (1985)

" Principles of Protein Structure." 7 ème édition, Charles R. Cantor ed., Springer Advanced Texts in Chemistry, New York

Simon E.S.; Plante R.; Whitesides G.M. (1989)

" D-Lactate Dehydrogenase. Substrate Specificity and Use as a Catalyst in the Synthesis of Homochiral 2-Hydroxy Acids." *Appl. Biochem. Biotech.*, 22 : 169-179

Smiley I.E.; Koekoek R.; Adams M.J.; Rossman M.G. (1971)

" The 5 Å Resolution of an Abortive Ternary Complex of Lactate Dehydrogenase and its Comparison with the Apo-enzyme." *J. Mol. Biol.*, 55 : 467-475

Stryer L. (1988)

" Biochemistry." 3ème édition, Freeman and Co., New York

- van Gunsteren W.F.; Weiner P.K. (1989)
" Computer Simulation of Biomolecular Systems. Theoretical and Experimental Applications." Escom Science Publishers B.V., Leiden
- Weber I.T. (1990)
" Evaluation of Homology Modeling of HIV Protéase" Prot. Struct. Funct. Gen., 7 (2) : 172-184
- Wetlaufer D.B.; Ristow S. (1973)
" Acquisitions of three-dimensional structure of proteins." Ann. Rev. Biochem., 42 : 135-158
- White J.L.; Hackert M.L.; Buehner M.; Adams M.J.; Ford G.C.; Lentz P.J.Jr.; Smiley I.E.; Steindel S.J.; Rossman M.G. (1976)
" A comparison of the Structures of Apo Dogfish M₄ Lactate Dehydrogenase and its Ternary Complexes." J. Mol. Biol., 102 : 759-779
- Wigley D.B.; Clarke A.R.; Dunn C.R.; Barstow D.A.; Atkinson T.; Chia W.N.; Muirhead H.; Holbrook J.J. (1987)
" The Engineering of a more Thermally Stable Lactate Dehydrogenase by Reduction of the Area of a Water-Accessible Hydrophobic Surface." Biochem. Biophys. Acta, 916 : 145-148
- Wilks H.M.; Halsall D.J.; Atkinson T.; Chia W.N.; Clarke A.R.; Holbrook J.J. (1990)
" Designs for a Broad Substrate Specificity Keto Acide Dehydrogenase." Biochem., 29 : 8587-8591
- Willemot R.M.; Durand G. (1988)
" Les Réacteurs Biologiques" La Recherche, 18 : 614-624
- Wu Y-D.; Houk K.N. (1991)
" Theoretical Evaluation of Conformational Preferences of NAD⁺ and NADH : An Approach to Understanding the Stereospecificity of NAD⁺/NADH-Dependant Dehydrogenases." J. Am. Chem. Soc., 113 : 2353-2358
- Zewe V.; Fromm H.J. (1962)
" Kinetic Studies of Rabbit Muscle Lactate Dehydrogenase." J. Biol. Chem., 237 (5) : 1668-1675

Zewe V.; Fromm H.J. (1965)

" Kinetic Studies of Rabbit Muscle Lactate dehydrogenase. II Mechanism of the Reaction." *Biochem.*, 4 (4) : 782- 792