



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude des bases moléculaires de la stéréospécificité de la lactate déshydrogénase : réalisation du mutant T246W

Devos, Damien

Award date:
1994

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.

301194



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

**ETUDE DES BASES MOLÉCULAIRES DE LA STÉRÉOSPÉCIFICITÉ
DE LA LACTATE DÉSHYDROGÉNASE:
RÉALISATION DU MUTANT T246W**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences**

biologiques

par

Devos Damien

Au terme de ce mémoire, je tiens tout particulièrement à remercier le professeur E. Feytmans de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie également Carla Vinals de m'avoir soutenu tout au long du mémoire; ce fut un plaisir.

Je remercie les autres membres du laboratoires, Etienne, Xavier et les autres mémorants, pour la bonne ambiance qu'ils ont su entretenir, et pour leur conseils techniques judicieux.

**Etude des bases moléculaires de la stéréospécificité
de la lactate déshydrogénase:
Réalisation du mutant T246W**

DEVOS Damien

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude des mécanismes assurant la stéréospécificité stricte de la L-LDH. La mutation T246W a été introduite dans la séquence de la L-LDH de muscle de lapin, en vue de diminuer l'espace disponible dans le site actif de l'enzyme. Ce Trp246, lorsqu'il sera combiné aux mutations Q102R et R171F, permettra de tester l'hypothèse d'inversion du pyruvate, devant conduire à la synthèse de D-lactate. La caractérisation des constantes cinétiques du mutant L-LDH/T246W a permis de mieux définir le rôle de la Thr246 dans la réaction de catalyse. A cette caractérisation, s'est ajoutée une analyse par modélisation des mutants T246W, Q102R/R171F et Q102R/R171F/T246W. Ces résultats ont permis de formuler l'hypothèse d'un rôle de stabilisation de l'état de transition du résidu Thr246.

Table des matières

Introduction	1
La glycolyse	2
Réduction du pyruvate en lactate	2
Enzymes NAD-dépendants	3
L-lactate déshydrogénase	3
Isoenzymes	4
Contrôle de la glycolyse par les isoenzymes de la L-LDH	5
Activation allostérique	5
L-LDH de muscle de lapin	6
Structure tertiaire	7
a) bras amino-terminal	7
b) domaine de fixation du NADH	7
c) domaine catalytique	7
Structure quaternaire	8
Réarrangements de la structure protéique	8
Cycle catalytique et structure du site actif de la L-LDH	8
Analyse du rôle des principaux résidus de la L-LDH impliqués dans le mécanisme catalytique	9
D-LDH	10
Généralités	10
Caractéristiques structurales	10
Caractéristiques cinétiques	11
Comparaison D-/L-LDH	11
Hypothèse de travail	13
But du travail	14
Résultats	15
Modélisation des structures de mutants de la L-LDH de muscle de lapin	15
Modélisation de l'enzyme mutant L-LDH/T246W	15
Modélisation des enzymes mutants L-LDH/Q102R/R171F et L-LDH/Q102R/R171F/T246W	17
Mutagenèse dirigée pour l'obtention d'un enzyme L-LDH/T246W	17
Première tentative de mutagenèse dirigée	17
Seconde tentative de mutagenèse dirigée	19
Tentative d'isolement de phages mutants	20
Construction du vecteur d'expression de la L-LDH/T246W	21
Construction de pGIPMCV6	21
Caractérisation de l'enzyme L-LDH/T246W	22
Surproduction de l'enzyme sauvage et mutant	22
Purification	22
Fluorescence	24
Cinétiques	24
Discussion et perspectives	27
Enzyme mutant L-LDH/T246W	27
Conclusion générale	29
Matériel	30
Souches bactériennes	30
<i>Escherichia coli</i> TG1 (Commercialisée par Amersham)	30
<i>E. coli</i> AR58 (43)	30
Plasmides	30
pOTSNco12 (dérivé du vecteur pAS (43))	30
pGIPM10 (41)	30
Phages	30
M13mp18 (Commercialisé par Amersham)	30
M13LDH646 (C. Vinals, non publié)	31

Tampons	31
Milieux de culture	32
Milieux solides.....	32
Milieux liquides.....	33
Solutions	33
Tampon et solutions pour gel d'électrophorèse d'acrylamide.....	35
Tampons et solutions pour chromatographie.....	36
Méthodes.....	36
Techniques relatives aux cellules.....	36
Préparation de cellules compétentes.....	36
Transformation par de l'ADN plasmidique.....	37
Transformation de cellules compétentes par un phage du type M13	38
Techniques relatives à l'ADN.....	39
Purification d'ADN	39
Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	43
Restriction d'ADN	43
Ligation de fragments d'ADN	44
Mutagenèse dirigée (Sculptor IVM system).....	44
Séquençage (T7Sequencing Kit)	45
Techniques relatives aux protéines.....	48
Production de LDH	48
Précipitation au sulfate d'ammonium	48
Mesure d'activité de l'enzyme L-LDH.....	49
Dosage de la concentration en protéines : Méthode de Folin	49
Electrophorèse de protéines en conditions non dénaturantes.....	49
Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	50
Purification de L-LDH de muscle de lapin	51
Fluorescence	51
Bibliographie.....	52
Annexes.....	57

Introduction

Les enzymes ont pour rôle de catalyser les réactions chimiques se déroulant dans la cellule ou l'organisme. Les enzymes doivent être spécifiques de leur substrat naturel, afin de ne pas catalyser des réactions dont les conséquences pourraient être indésirables. Certains enzymes peuvent être d'une spécificité assez large ou au contraire très restrictive et discriminer des substrats qui ne diffèrent que par un simple groupe méthyl, ou même entre des stéréoisomères (1).

Les propriétés d'un stéréoisomère par rapport à un autre peuvent varier fortement. Dans le domaine pharmaceutique, entre autres, il est parfois indispensable de ne produire qu'un type de stéréoisomère et même, d'éviter la formation de l'autre, ce qui est parfois difficile par synthèse chimique. Ce problème est évité dans la nature, car certains enzymes sont capables de transformer un substrat donné en un seul stéréoisomère du produit, généralement de manière exhaustive. Ils sont appelés stéréospécifiques.

Un des buts fondamentaux de la biochimie moderne est de définir les relations fondamentales entre structure et fonction des protéines. Notre compréhension actuelle de la relation structure-fonction peut être approfondie grâce notamment à l'étude de la spécificité de substrat par mutagenèse dirigée. Il est généralement admis que la spécificité pour un substrat est déterminée par les acides aminés qui sont en contact direct avec celui-ci, plutôt que par des interactions plus lointaines. Il s'ensuit que les meilleures cibles pour des expériences de mutagenèse sont les sites de fixation du substrat. Ceux-ci sont composés des chaînes latérales des acides aminés en contact direct avec le substrat. Les chaînes latérales peuvent, dans certains cas, être substituées sans causer de changements structuraux importants, et le remplacement peut être fait relativement facilement avec les méthodes actuelles de l'ingénierie génétique. En revanche, il est plus difficile de changer la structure de la chaîne principale d'une manière prévisible, et de tels changements causent nécessairement des distorsions dans la structure globale de la protéine. La mutagenèse dirigée peut être utilisée pour altérer la spécificité de substrat ou pour induire de nouvelles spécificités dans des enzymes existants. En particulier, les résidus qui sont plus susceptibles d'être responsables de la différence de spécificité de substrat entre protéines homologues peuvent être identifiés par comparaison des séquences en a.a.. La mutagenèse dirigée peut être alors utilisée pour déterminer si les résidus identifiés sont suffisants pour définir la spécificité de substrat.

C'est dans ce cadre que se situe l'étude des bases moléculaires de la stéréospécificité de la L-lactate déshydrogénase. Cet enzyme tétramérique catalyse

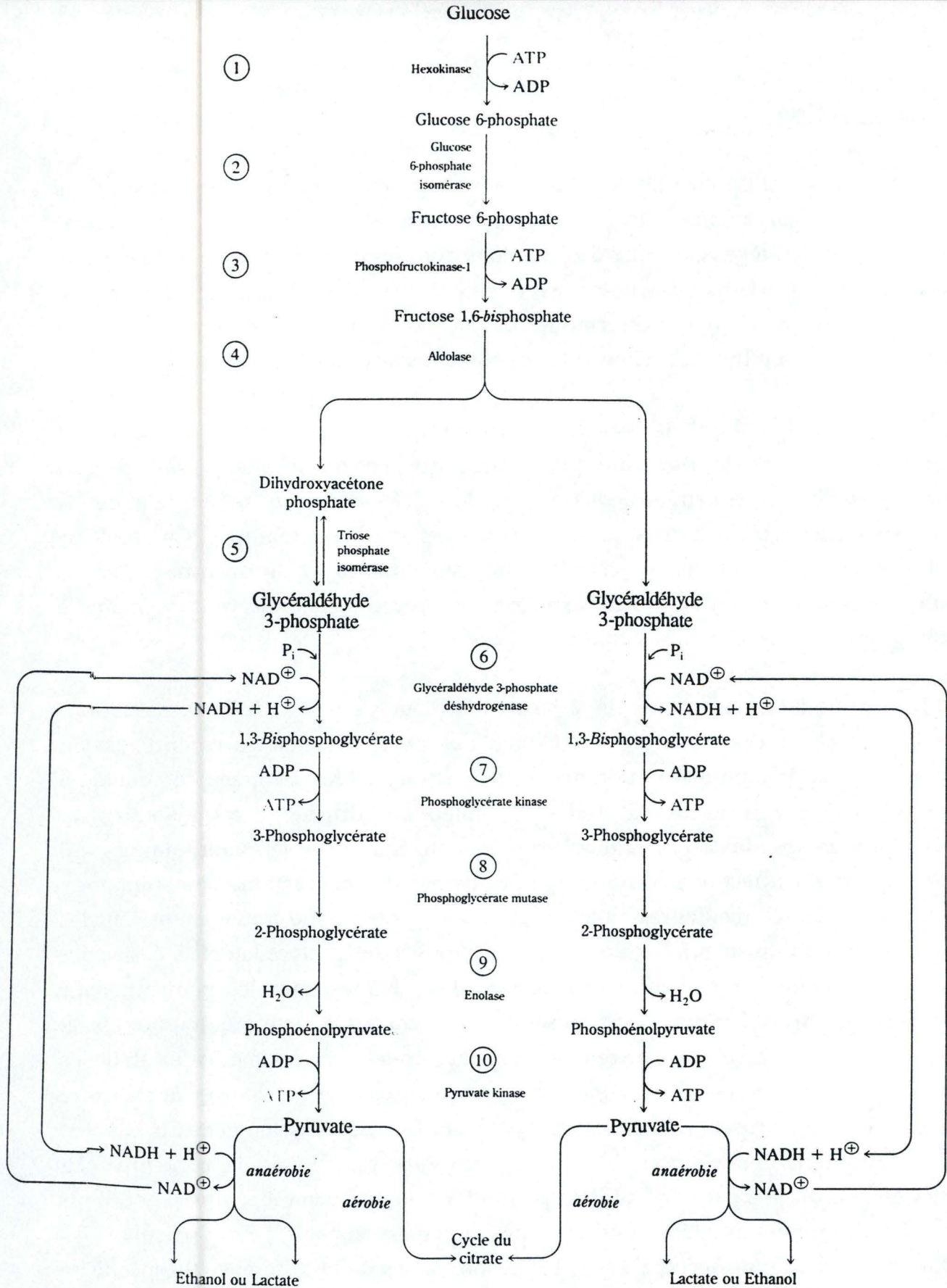


Figure 1: Représentation de la glycolyse. Une molécule de glucose est dégradée en deux molécules de pyruvate. Les deux molécules de NAD^+ consommées lors de la glycolyse sont régénérées lors des étapes spécifiques aux voies fermentaires anaérobies. D'après Rawn (1990).

la réduction du pyruvate en L-lactate en régénérant le NAD^+ . L'étude de la stéréospécificité de cet enzyme devrait nous permettre d'approfondir nos connaissances de ce mécanisme et de contribuer au développement de l'ingénierie protéique.

La glycolyse

Les étapes enzymatiques de dégradation du glucose et la récupération d'énergie sous forme d'ATP sont regroupés sous les termes de fermentation (en conditions anaérobies) et respiration (en conditions aérobies). Parmi les nombreux types de fermentation du glucose, deux prédominent. Dans la *fermentation homolactique*, la molécule à six carbones ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) est dégradée en deux molécules identiques à trois carbones, l'acide lactique ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$), qui constitue le seul produit final. Ce type de dégradation du glucose a lieu aussi bien chez de nombreux micro-organismes que dans les cellules des animaux supérieurs, en particulier des mammifères. Il est habituellement désigné sous le nom de *glycolyse*. Dans la *fermentation alcoolique*, les six atomes de carbone du glucose sont scindés en deux molécules d'éthanol à deux carbones ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) et deux molécules de CO_2 . La *fermentation alcoolique* utilise la même voie enzymatique que la *glycolyse*, mais avec deux étapes supplémentaires qui scindent les molécules à trois carbones provenant de la dégradation du glucose en éthanol et CO_2 . La plupart des autres types de fermentation du glucose ne constituent que des variantes de la voie principale, la *glycolyse* (2) (Figure 1).

L'équation globale de la glycolyse est :



Réduction du pyruvate en lactate

Dans la dernière étape de la fermentation lactique, le pyruvate est réduit en lactate par les protons cédés précédemment par le glycéraldéhyde-3-phosphate. Ces protons permettent la régénération du NAD^+ qui sert d'intermédiaire de transport. La réaction est catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH) (3) (Figure 2).

La réduction du pyruvate en isomères L(-)- ou D(+)-lactate est catalysé par différents enzymes généralement NAD-dépendants, les L-lactate et D-lactate déshydrogénases (L- et D-LDH).

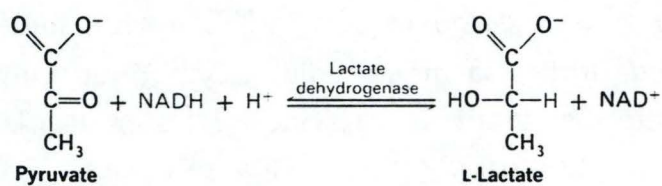
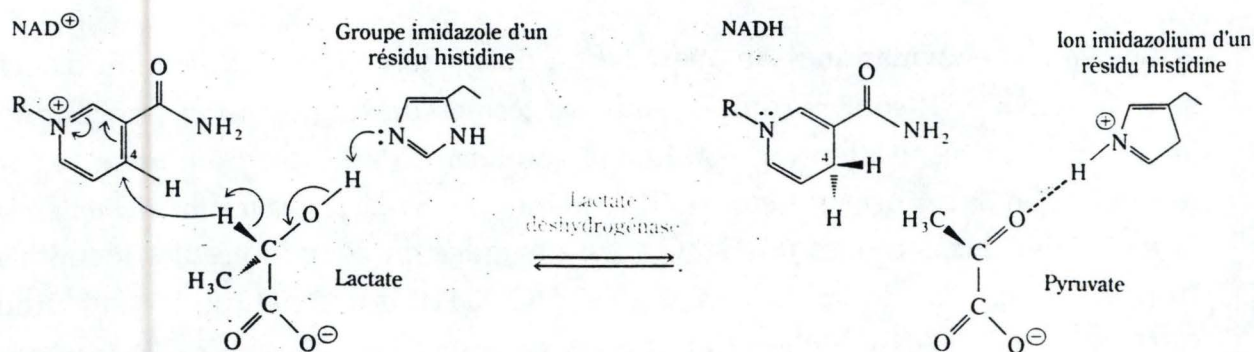


Figure 2: Représentations de la réaction catalysée par la lactate déshydrogénase. D'après Rawn (1990).

Enzymes NAD-dépendants

La réaction de réduction du pyruvate en lactate comprend notamment le transfert d'un ion hydrure. Cette attaque nucléophile consiste en la migration d'un noyau d'hydrogène accompagné de deux électrons ($H^- = \text{proton} + 2e^-$), d'un atome vers un autre. Le transfert d'un anion hydrure n'est généralement pas accompagné d'un échange avec les protons du solvant. L'hydrogène est transféré directement du donneur à l'accepteur. Le transfert du proton et des deux électrons est simultané, c'est-à-dire qu'aucune différence de temps n'est détectable lors du transfert des deux électrons (4).

Les études comparatives des structures tridimensionnelles des enzymes utilisant le NAD^+ comme cofacteur dans le transfert hybride ont révélé que ces protéines possèdent un domaine de fixation du coenzyme extrêmement conservé, et un domaine catalytique variable, selon les substrats dont ils sont spécifiques. Néanmoins, ce domaine catalytique est similaire quand les substrats sont similaires; par exemple, les L-lactate et L-malate déshydrogénases utilisent les 2-oxo et 2-hydroxy acides comme substrat.

L-lactate déshydrogénase

Les micro-organismes, les animaux et les végétaux possèdent tous, soit une L-LDH, soit une D-LDH, parfois les deux. Les vertébrés ne possèdent que la L-LDH. Le D-lactate est d'ailleurs un produit toxique pour ces derniers et la D-LDH ne se trouve que chez les animaux inférieurs (5), les bactéries (6, 7) et les champignons (8).

Chez les vertébrés, l'enzyme L-LDH se trouve principalement dans le cytoplasme des tissus musculaires. Son rôle principal est de régénérer le NAD^+ , en absence d' O_2 (3).

Certaines L-LDH sont fonctionnelles sous forme dimérique; d'autres, plus fréquentes, sous forme tétramérique (6). Les L-LDH bactériennes seules, sont activées allostériquement par le fructose 1,6 biphosphate (9).

Le L-lactate constitue le produit final de la séquence glycolytique en conditions anaérobies. Il diffuse à travers la membrane plasmique de la cellule dans le milieu extracellulaire et correspond à un déchet. Lorsque les muscles des animaux supérieurs ont à fournir, en anaérobiose, pendant de courtes périodes, une activité très intense, les cellules musculaires déversent dans le sang des quantités importantes de L-lactate : celui-ci est retransformé ultérieurement en glucose au

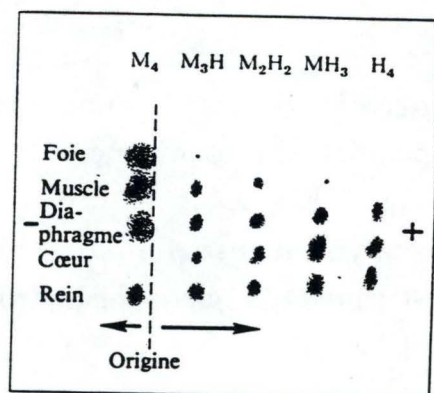


Figure 3: Séparation des isoenzymes de lactate déshydrogénase par électrophorèse en conditions natives avec révélation de l'activité enzymatique. Les quantités relatives des différents isoenzymes dépendent des tissus prélevés (d'un rat blanc adulte dans cet exemple). D'après Lehninger (1985).

niveau du foie. La fatigue et la rigidité des fibres musculaires est due en partie à cette acidification (2).

Isoenzymes

Certains enzymes existent sous plusieurs formes moléculaires, dans une espèce donnée, ou même dans une cellule donnée, principalement chez les vertébrés. Les formes différentes d'un même enzyme peuvent être détectées et séparées dans les extraits cellulaires par électrophorèse sur gel d'acrylamide, en conditions non dénaturantes : il s'agit donc de structures distinctes qui diffèrent notamment par leur charge électrique globale, leur affinité pour le substrat, par la vitesse maximale de la réaction catalytique et par leurs propriétés régulatrices. Lorsqu'elles coexistent dans une espèce donnée ou dans une cellule donnée, on les appelle *isoenzymes* ou *isozymes* (2).

L'un des premiers enzymes de ce type étudié de façon approfondie, la L-LDH existe sous cinq formes majeures différentes, ou isoenzymes, qui se distinguent par leur affinité pour les substrats. Bien que ces cinq isoenzymes catalysent la même réaction globale, ils présentent vis-à-vis de leurs substrats des K_M (constante d'affinité) différents, jouant un rôle dans la régulation de la glycolyse. Les cinq isoenzymes ont le même poids moléculaire, d'environ 134000 D, et chacun d'eux est formé de quatre monomères peptidiques de 33 500 D. Ces isoenzymes ne sont en fait que des hétérotétramères de deux monomères peptidiques différentes : le monomère M et le monomère H. L'un des isoenzymes, qui prédomine dans le muscle, présente quatre monomères M et est représenté par le symbole M_4 ; un autre isoenzyme, que l'on retrouve surtout dans le coeur, est formé de quatre monomères H et est représenté par le symbole H_4 . Les trois autres isoenzymes correspondent aux trois combinaisons restantes des monomères M et H : M_3H , M_2H_2 , et MH_3 . Ces monomères M et H sont codés respectivement par les gènes m et h. La composition brute et la séquence en a.a. des différents monomères diffèrent.

Isolé, un monomère est dépourvu d'activité. Lorsqu'on mélange ces différents monomères en proportions convenables, ils reforment spontanément in vitro tous les isoenzymes naturels de la L-LDH.

Les monomères peuvent s'associer avec des monomères de l'un ou de l'autre type, selon le taux d'expression relatif des 2 gènes dans la cellule. Il a été montré que la synthèse des peptides H et M est contrôlée par deux gènes de structure différents, et que la proportion de chaque peptide élaboré dans une cellule, est soumise à une régulation génétique.

La figure 3 montre que les isoenzymes de la L-LDH existent en différentes proportions dans différents tissus.

Une étude montre que les similarités entre sous-unités M ou H d'espèces différentes sont plus fortes qu'entre les sous-unités M et H de la même espèce (10).

Il existe également un troisième type de monomère de L-LDH appelé X, codé par le gène x (11). Celui-ci est exprimé majoritairement dans les testicules et permet la formation de l'homotétramère X₄.

Contrôle de la glycolyse par les isoenzymes de la L-LDH

Les isoenzymes M₄ et M₃H prédominent dans les tissus qui tirent leur énergie de la glycolyse, comme le muscle squelettique ou les tissus embryonnaires (2). Les isoenzymes MH₃ et H₄ prédominent au contraire dans ceux qui ont un métabolisme aérobie ou respiratoire. L'étude approfondie des propriétés cinétiques des différents isoenzymes de la L-LDH a montré que les isoenzymes des tissus à glycolyse intense produisent préférentiellement du pyruvate, et que les isoenzymes des tissus à activité respiratoire élevée en produisent relativement moins. Les isoenzymes de la L-LDH présents dans le muscle à activité glycolytique réoxydent très efficacement le NADH aux dépens du pyruvate en formant du lactate, alors que les isoenzymes des muscles aérobies produisent moins de lactate, et permettent au NADH d'être alors plus facilement réoxydé par la mitochondrie. La synthèse des isoenzymes de la L-LDH est génétiquement programmée de telle manière que la régulation des réactions productrices d'énergie soit en rapport avec l'état du développement ou de différenciation des cellules.

Il est avantageux pour des tissus aérobies (par exemple, le coeur et le cerveau) de retenir une quantité significative de pyruvate qui peut être oxydé dans le cycle de l'acide citrique et résulter en la production d'ATP. Par ailleurs, dans les tissus anaérobies comme dans les muscles squelettiques, où il n'y a qu'occasionnellement une forte demande en énergie et où la production d'ATP n'est pas possible via le cycle de l'acide citrique, un métabolisme glycolytique optimal est essentiel. Le produit final, l'acide lactique pouvant être recyclé dans la circulation sanguine (3).

Activation allostérique

Plusieurs L-LDH de source procaryotique sont allostériquement activés par un produit intermédiaire de la glycolyse, le fructose-1,6-biphosphate (FBP) (12). Cette activation allostérique est une des principales différences entre les L-LDH pro- et eucaryotiques. Le site de fixation du FBP des L-LDH procaryotiques est remplacé chez les enzymes eucaryotiques par un site de fixation d'anion sulfate. La comparaison du site d'activation de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* avec le site de fixation de l'anion sulfate de la L-LDH de muscle de roussette ne montre

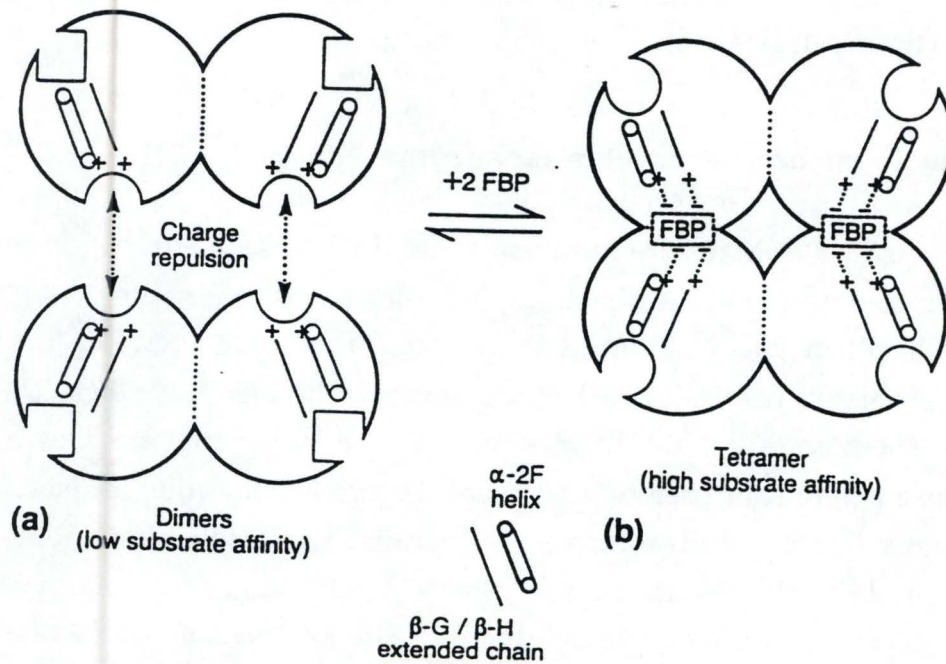


Figure 4: Le fructose-1,6-biphosphate (FBP) favorise l'association de deux dimères de L-LDH bactérienne en tétramères. Le FBP agit en tant qu'activateur allostérique. Les dimères présentent une faible affinité pour le pyruvate (K_M de 2.5 mM) tandis que les tétramères ont une forte affinité pour le pyruvate (K_M de 0.05 mM). D'après Clarke *et al.* (1989), Part II.

au niveau des séquences aucune différence significative entre les résidus concernés dans ces sites (9). Lorsque la L-LDH est en concentration similaire à celle rencontrée dans la cellule, l'enzyme est sous forme de dimère (affinité pour le substrat faible). Ces dimères ne s'associent pas facilement en tétramères car au total huit (2×4) charges positives se retrouvent opposées. Dans chaque monomère de L-LDH, il existe une poche contenant deux charges positives portées par deux résidus, l'Arg173 et l'His188, dans laquelle le groupe phosphate du FBP peut se placer (figure 4). Ces deux résidus forment l'extrémité de deux structures secondaires, une hélice α pour l'Arg173 et un feuillet β pour l'His188. A l'extrémité de ces deux structures se trouvent respectivement l'Arg171 et l'His195 (résidus clefs du site actif). Le complexe FBP-tétramère a 50 fois plus d'affinité pour le pyruvate que le dimère. La formation de tétramère engendre des modifications du site de liaison du substrat qui lui donnent une activité optimale, et le FBP est indispensable à cette tétramérisation chez les procaryotes (9).

Cette régulation est métaboliquement significative puisque la conversion du pyruvate en L-lactate est critique dans la détermination de l'utilisation des sources de carbone dans la fermentation bactérienne. Quand l'enzyme est actif, le glucose est converti en lactate, en régénérant le NAD^+ , pour poursuivre la glycolyse ; quand il est inactif, d'autres produits de fermentation sont générés (p. e., acétate, formate, dioxyde de carbone et éthanol). Des expériences sur des bactéries streptococcales ont montré qu'en conditions d'excès de glucose, il y a une augmentation du niveau intracellulaire de FBP ce qui provoque une activation de la L-LDH, et le lactate est sécrété comme seul produit de fermentation. Cependant, quand le glucose est limitant dans le milieu de croissance, la concentration intracellulaire du FBP est indétectable, et 90% de la source de carbone est convertie en acétate (malgré le fait que l'organisme soit traditionnellement considéré comme un fermenteur homolactique.) (13).

L-LDH de muscle de lapin

La L-LDH de muscle de lapin, objet de notre travail, est un homotétramère M_4 . Chaque sous-unité est codée par une séquence de 1614 nucléotides contenant une phase ouverte de lecture de 996 paires de bases (10). Chaque sous-unité ayant un poids moléculaire de 35-40.000 et l'enzyme actif étant sous forme tétramérique, celle-ci a un poids moléculaire de 140.000. Elle utilise le NAD^+/NADH comme cofacteur (3).

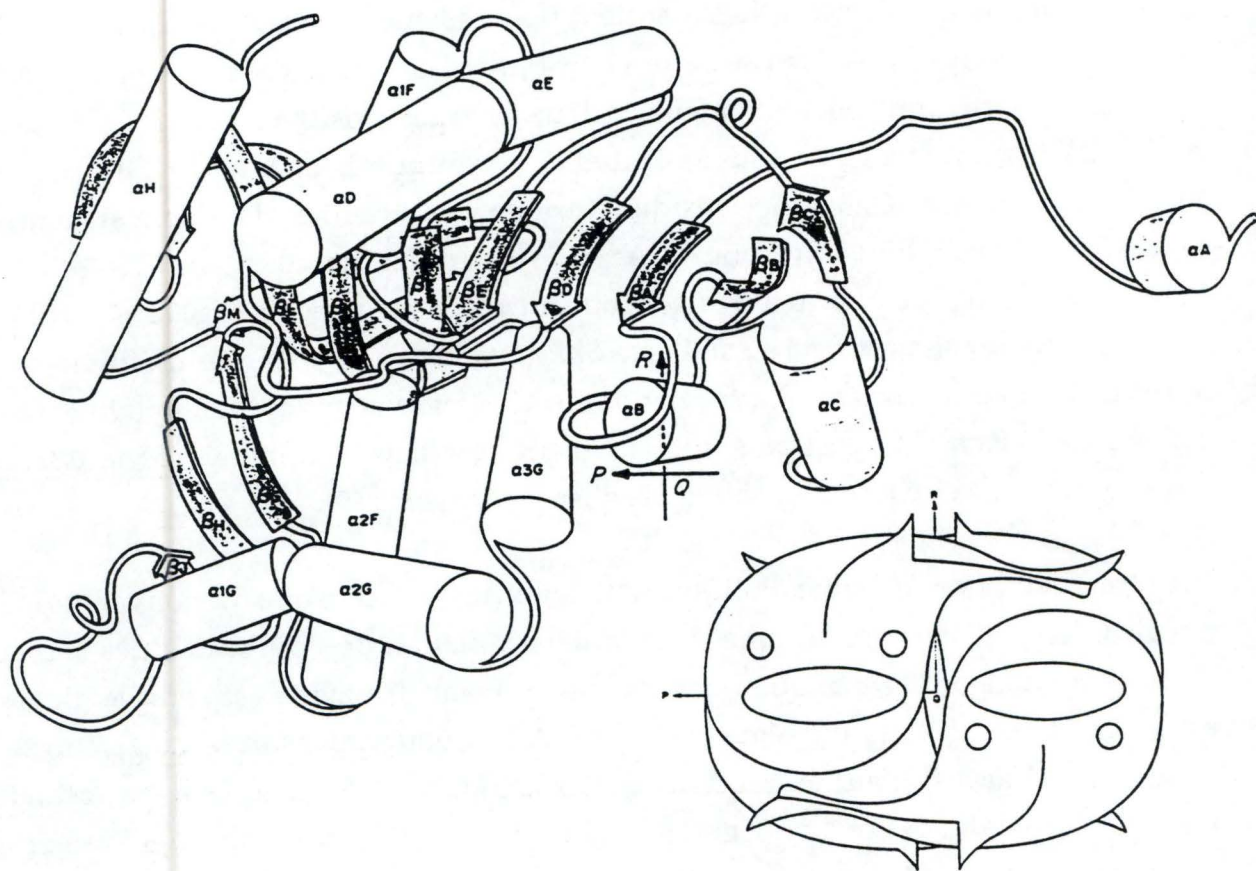


Figure 5: Représentation schématique de la structure d'un monomère de lactate déshydrogénase d'eucaryote. Les brins β sont nommés βA à βJ , et les hélices α sont notées αA à αH . L'arrangement des monomères en tétramère est représenté en bas à droite. La queue amino-terminale de chaque monomère, qui porte l'hélice αA , interagit avec une autre sous-unité. D'après Papadopoulos *et al.* (1990).

Structure tertiaire

La structure de chaque monomère peut-être décomposée en a) un bras amino-terminal, b) un domaine liant le coenzyme et c) un domaine contenant les résidus catalytiques (3), (5). Globalement, la structure du complexe tertiaire actif de chaque monomère des L-LDH eucaryotiques peut être envisagée comme une structure globulaire d'où dépasse un 'bras' de peptides (14) (photo 1).

a) bras amino-terminal

Bien qu'extrêmement conservées dans la plus grande partie de leurs séquences primaires, la différence la plus importante entre les L-LDH d'eucaryotes et de procaryotes est située dans la partie NH₂-terminale de leur séquence. Les L-LDH eucaryotiques ont un bras NH₂-terminal de 15-20 a.a. qui s'étend du 'corps' principal de la sous-unité. Les L-LDH bactériennes ne possèdent pas les 14 premiers résidus formant ce bras (14).

L'état tétramérique de la structure quaternaire des L-LDH eucaryotiques peut être considéré comme un dimère de dimères stabilisé par les bras NH₂-terminaux de chaque sous-unité (14), (3). La protéine cristallise dans un système orthogonal (figure 5). Les axes cristallographiques sont nommés P, Q et R. Les interactions entre sous-unités sont divisées en 3 contacts principaux selon ces axes (3). Dans ce système, les contacts réalisés par le bras NH₂-terminal sont entièrement situés dans l'axe R (5), (15) (Figure 5).

b) domaine de fixation du NADH

Le domaine de fixation du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) est divisé en 2 régions fixant chacune un des mononucléotides constituant le NADH (B1 et B2) (3). Chacune de ces régions est de structure similaire. La région B1 est responsable de l'accrochage de l'AMP (adénosine monophosphate) et la région B2 de celui du NMN (nicotinamide mononucléotide).

Les structures secondaires suivantes font partie du domaine de fixation du NAD : αA , βA , αB , βB , αC , βC , βD , αE , βE et βF . La photo 2 montre bien la structure en plan β de ce domaine.

c) domaine catalytique

Le domaine catalytique peut, lui aussi, être divisée en 2 régions, présentant d'importantes similarités (C1 et C2). Chacune de ces deux régions peut être décrite comme une structure $\alpha\beta\beta\alpha$, structure à trois brins β antiparallèles avec un retour immédiat d'un brin dans le suivant, ces trois brins étant suivis et précédés d'une hélice α (3) (figure 5).

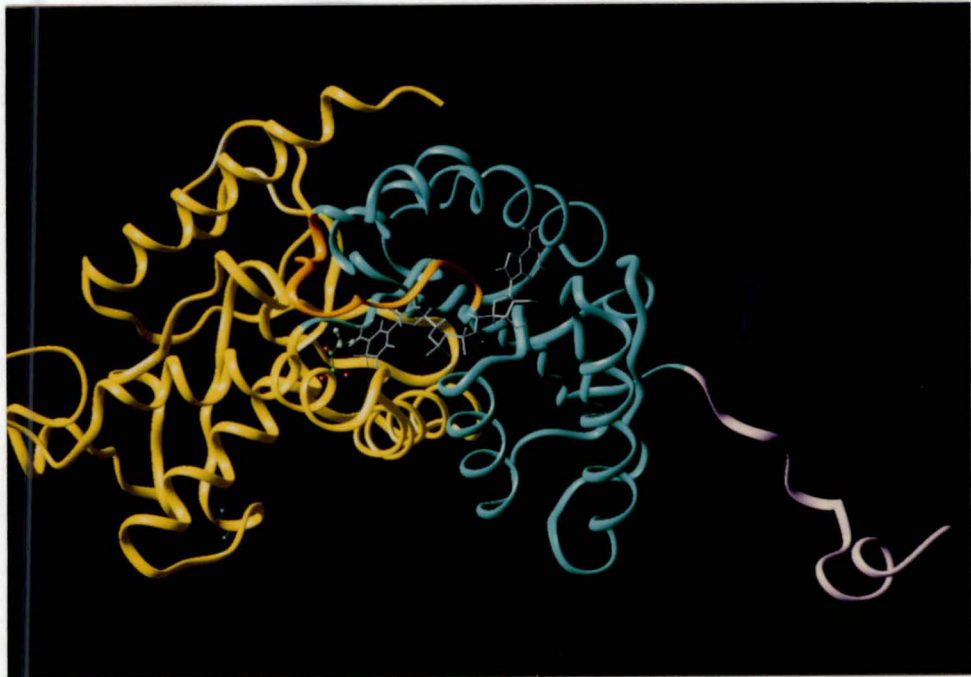


Photo 1: Représentation en ruban du modèle de la L-LDH de muscle de lapin. La vue est présentée perpendiculairement à l'axe Q.



Photo 2: Représentation en ruban du modèle de la L-LDH de muscle de lapin. La vue est présentée perpendiculairement à l'axe P. La boucle qui ferme la poche de fixation du substrat est particulièrement bien visible selon cette orientation.

Le domaine catalytique comprend les structures secondaires suivantes; $\alpha 2F$, βG , βH , βJ , $\alpha 1G$, $\alpha 2G$, $\alpha 3G$, βK , βL , βM et αH .

Structure quaternaire

Dans le complexe ternaire (L-LDH-NADH-substrat), les sous-unités de L-LDH s'associent en un tétramère présentant une symétrie parfaite selon les trois axes définis plus haut. Seul le complexe tétramérique est catalytiquement actif, ce qui suggère que les interactions entre sous-unités contribuent à l'intégrité structurale du site actif (15). Une évaluation de la répartition des surfaces de contacts entre sous-unités démontre que 50 % de ces contacts sont réalisés selon l'axe Q (15). Chaque bras de sous-unité interagit avec le côté opposé de l'autre sous-unité en suivant l'axe P (3), (15), (5).

Cet état tétramérique nécessite la présence de sulfate dans le milieu. Cela peut être expliqué grâce à une relation structurelle entre le site actif et la région d'interaction entre sous-unités selon l'axe P (9).

Réarrangements de la structure protéique

Le mécanisme catalytique de l'enzyme L-LDH comporte l'addition séquentielle et ordonnée du coenzyme suivi du substrat. Le complexe ternaire devient actif lors d'un changement conformationnel comprenant la fermeture d'une boucle externe (résidus 98-112) sur le site actif, celui-ci est alors isolé du solvant (15).

Ce changement conformationnel a été décrit comme étant l'étape limitante pour l'enzyme sauvage avec ses substrats naturels (16).

Cycle catalytique et structure du site actif de la L-LDH

Si l'on observe les structures des L-LDH dont on dispose, on peut généraliser le mode de fixation du substrat de la façon suivante :

Le substrat oxydé est maintenu dans la position adéquate notamment par l'action combinée des résidus Arg171 et Gln102. L'arginine 171 forme deux ponts hydrogène avec le groupe carboxyle du substrat, le maintenant dans la position voulue. Les premiers atomes de la chaîne latérale de la glutamine 102 participent à la formation d'un environnement hydrophobe autour du groupe méthyle du pyruvate (17).

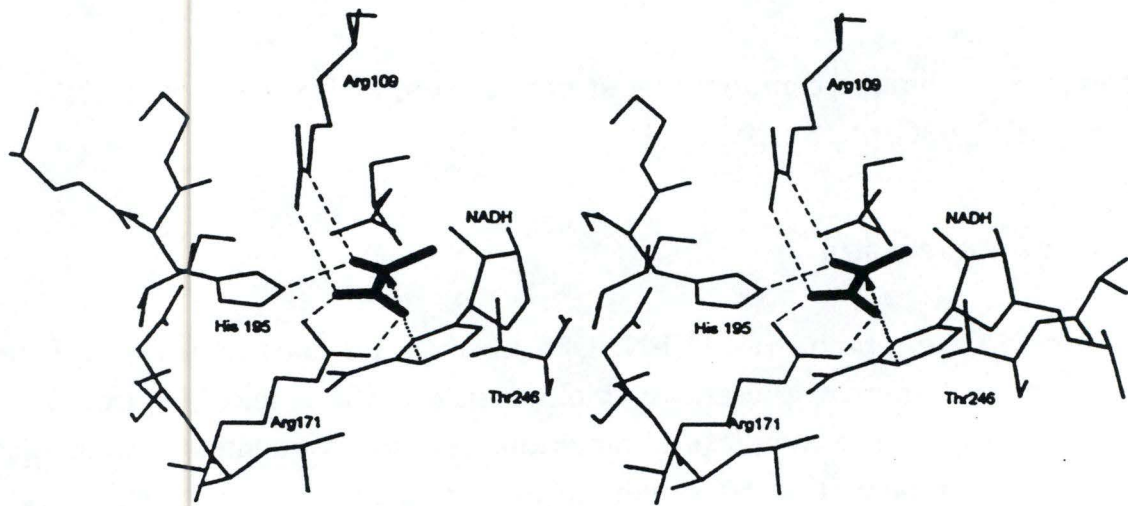


Figure 6: Position du pyruvate dans le site actif de la L-LDH. Le pyruvate, maintenu par l'His195, l'Arg109 et l'Arg171, est correctement positionné pour le transfert d'un ion hydrure à partir du NADH. Le transfert d'hydrure est symbolisé par une flèche en pointillé. D'après Sakowicz *et al.* (1993).

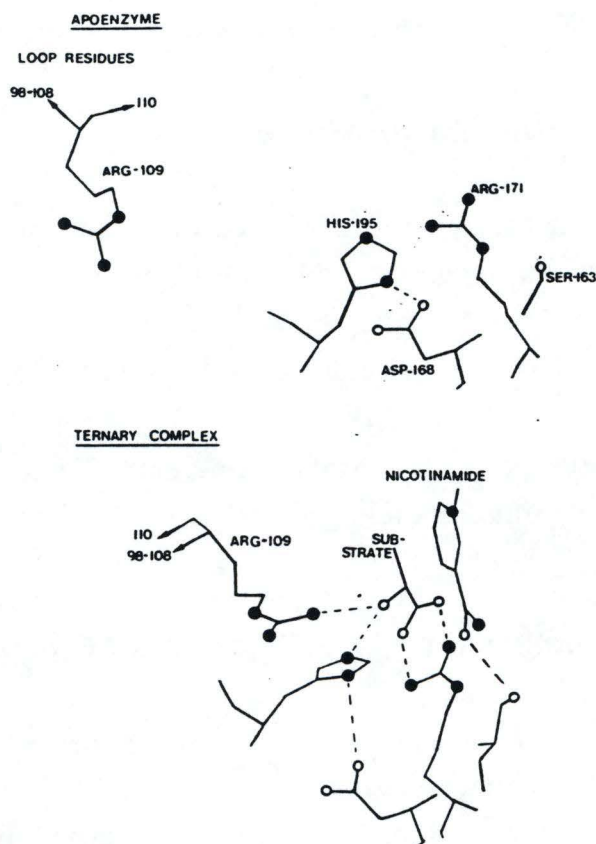


Figure 7: Mouvement de l'Arg109 suite à la fixation du substrat. La fermeture d'une boucle sur la poche de fixation du substrat amène l'Arg109 à proximité du substrat. Dans le complexe ternaire, le groupement guanidium de l'Arg109 interagit avec le groupement carboxyl du pyruvate. D'après Clarke *et al.* (1986).

Par l'action de ces deux a.a., le pyruvate est maintenu dans une position où son groupe carbonyle est situé à une distance de l'His195 (l'histidine catalytique) compatible avec le transfert d'un proton. Simultanément, le noyau dihydronicotinamide du NADH libère un ion hydrure vers l'atome de carbone de ce même groupe (figure 6) (17).

Analyse du rôle des principaux résidus de la L-LDH impliqués dans le mécanisme catalytique

Histidine 195 : l'His195 est le résidu catalytique responsable du transfert d'un atome H^+ vers le groupement carbonyle du pyruvate (3).

Arginine 171 : l'Arg171 est un des résidus responsables de la stéréospécificité de la L-LDH. C'est ce résidu qui est notamment responsable du maintien du pyruvate dans une position rigide qui induit la formation du stéréoisomère L du lactate (17).

Glutamine 102 : la Gln102 est également d'une importance fondamentale pour la spécificité de substrat de la L-LDH. Ce résidu est situé sur la boucle mobile et se trouve après le réarrangement structural à proximité du groupe méthyl du substrat (18).

Arginine 109 : le rôle joué par l'Arg109 doit être d'une importance fondamentale, puisque ce résidu est conservé dans toutes les séquences de L-LDH connues et dans l'enzyme homologue malate déshydrogénase. Tout comme la Gln102, cet a.a. est situé sur la boucle mobile de l'enzyme. Lors du réarrangement structural dû à la formation du complexe ternaire, l'arginine 109 se déplace de 0,8 nm de sa position initiale dans le solvant vers sa position dans le site actif, où son groupe guanidium se trouve à une distance compatible avec la formation de ponts hydrogènes avec le carbonyle du pyruvate (figure 7). Il a été suggéré que l'arginine 109 permet la polarisation du groupe carbonyle du pyruvate dans l'état initial, et stabilise l'état de transition (19).

Thréonine 246 : le rôle exact joué par la thréonine 246 n'est pas encore tout à fait clair. La Thr246 est un résidu important du site actif (20), (21), conservé dans toutes les séquences de L-LDH connues. De plus, dans la malate DH, la position correspondante est occupée par la Ser241 (22), ce qui indique qu'un groupement hydroxyle à cette position est important pour une fonction catalytique correcte.

Récemment, il fut proposé que le groupe hydroxyle de la Thr246 puisse former un lien hydrogène de 2,5 Å avec le groupe carboxyle d'un analogue de substrat, l'oxamate (23). Cette interaction a été proposée comme l'une des interactions 'de secours' qui contribue à retenir l'orientation stéréospécifique du substrat même lors

de l'absence du résidu clé de l'accrochage du substrat, l'Arg171 (24). De plus, la chaîne latérale de la Thr246 réduirait le volume de cette partie du site actif, qui pourrait éventuellement être occupée par les chaînes aliphatiques des substrats 2-keto acides.

Des essais de mutagenèse dirigée ont été réalisés pour tenter d'augmenter le volume du site actif (20), (21), (25) mais l'enzyme résultant avait une activité spécifique d'environ trois ordres de grandeur plus faible. Cette diminution d'activité est attribuée à la perte du lien du groupement hydroxyle de la Thr246 au groupement carboxyle du substrat et également à la possibilité d'accès au site actif par des molécules d'eau externes.

Une autre explication possible de l'intérêt catalytique conféré par l'hydroxyle de la Thr246, qui concorde avec toutes les observations expérimentales, serait qu'il active le noyau dihydronicotinamide du cofacteur NADH (21).

D-LDH

Généralités

L'enzyme stéréospécifique NAD-dépendante D-lactate déshydrogénase catalyse la réduction réversible de 2-oxo acides en R-2-hydroxy acides. Il appartient à la famille des D-hydroxyacide déshydrogénases (7), présentes dans les bactéries (6) comme dans les champignons (8) et les invertébrés (5). Seules quelques D-LDH ont été séquencées à ce jour (7), (6), aucune structure n'ayant été déterminée à ce jour. Elles sont mal connues, contrairement aux L-LDH qui ont été largement étudiées.

Caractéristiques structurales

Les D-LDH bactériennes sont des enzymes tétramériques ou dimériques d'un poids moléculaire d'approximativement 34-38.000 par sous-unité (6). Certaines D-LDH bactériennes comme celles d'*Escherichia coli* (26) sont des enzymes liés à la membrane, et ne sont pas apparentées aux D-LDH solubles NAD-dépendantes.

Les D-LDH d'invertébrés sont elles aussi dimériques ou tétramériques (5) mais elles ont encore été peu étudiées.

Récemment, il a été montré que la formate déshydrogénase (FDH) de *Pseudomonas sp.*, dont on connaît la séquence et la structure (27) fait partie de la famille des D-2-hydroxy acides déshydrogénases (28).

L'alignement de séquences entre cette FDH et les autres protéines de ce groupe a servi de base à la modélisation de la D-LDH de *Lactobacillus bulgaricus*. Une structure hypothétique du site catalytique basée sur ce modèle a pu être proposée (29). Celui-ci serait principalement formé par une série de boucles conservés, principalement localisées dans l'interface interdomaine : les résidus impliqués dans l'activité catalytique sont distribués dans toute la séquence et les degrés de conservation sont variables.

L'analyse de ce modèle ainsi que du degré de conservation des a.a. dans l'alignement de séquences suggèrent que le résidu conservé Arg284 de la D-LDH est un résidu clé pour la fixation du substrat, dont le rôle serait comparable au résidu Arg171 de la L-LDH. De même, le résidu His296 serait l'His catalytique, la Tyr101 et le Trp299 fermeraient la poche de fixation du substrat en créant une région hydrophobe autour du méthyl du substrat.

Caractéristiques cinétiques

Bien que les données concernant l'organisation du site catalytique de l'enzyme restent rares, quelques résultats expérimentaux permettent de penser que l'Arg235, l'His303, la Tyr101 et le Trp19 de D-LDH de *L. bulgaricus* pourraient se situer dans ou à proximité du site actif (30). Récemment, il a été montré que l'His296 est bien l'histidine catalytique de la D-LDH de *L. plantarum* (31).

Néanmoins, l'absence de structures cristallographiques sur la D-LDH hypothèque toute certitude sur le mécanisme catalytique.

D'autre part, l'analyse des données cinétiques montre que la spécificité des D-LDH est plus stricte que celle des L-LDH, et serait probablement due à un site actif moins volumineux (30).

Comparaison D-/L-LDH

Plusieurs séquences et structures de L-lactate déshydrogénases ont été déterminées et caractérisées (15), (32), (33), (11) avant l'obtention de la première séquence de D-lactate déshydrogénase en 1991 (7).

Bien que toutes les L-lactate déshydrogénases semblent appartenir à la même famille évolutive, les premiers résultats obtenus sur les D-LDH et notamment les comparaisons de séquences indiquent que ces dernières forment une famille distincte, ayant probablement une origine évolutive différente (34). La possibilité que la L- et la D-LDH aient divergé si tôt dans leur évolution qu'aucune similarité significative entre leurs séquences ne soit détectée, hormis le motif de glycines caractéristique de la fixation d'un nucléotide (35), semble improbable. L'hypothèse proposée est donc celle de la convergence évolutive.

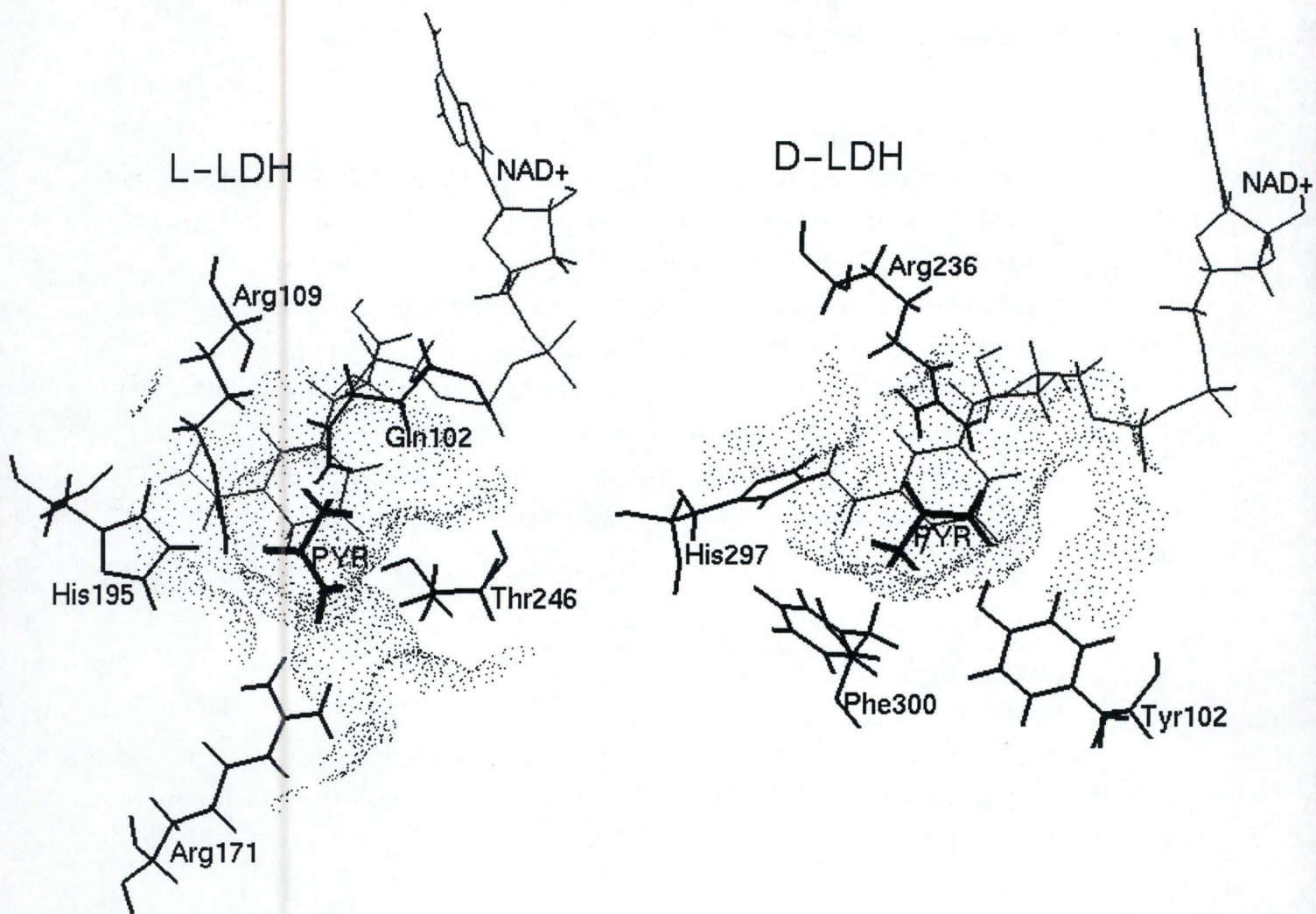


Figure 8: Représentation des sites actifs de la structure de la L-LDH de muscle de roussette et de la D-LDH de *Lactobacillus bulgaricus*.

Dans la L-LDH, la stéréospécificité stricte envers le substrat est souvent expliquée par le fait que le pyruvate est, dans le site actif, restreint à une position dans laquelle l'Arg 171 forme un lien hydrogène avec son groupe carboxyl, tandis que l'oxygène du groupe carbonyle interagit avec l'His 195 (36).

Il a été suggéré par différents auteurs (37, 38) que les sites actifs des L- et D-LDH pourraient être analogues. Récemment, une telle analogie entre les structures de la L-LDH et la D-glycérate déshydrogénase (DGDH) fut proposée (38). Or, la DGDH est une D-hydroxyacide déshydrogénase homologue de la D-LDH. Lorsqu'on superpose le noyau nicotinamide de la molécule du NADH de la DGDH et celui de la structure de la L-LDH de muscle de roussette, l'His catalytique de la DGDH et l'His195 de la L-LDH sont localisées approximativement à la même position. Cette observation est valable lorsque l'on superpose de la même façon la structure de la L-LDH et le modèle de la D-LDH de *Lactobacillus bulgaricus*. Si on définit ensuite grossièrement, dans la L-LDH, un plan formé par le noyau nicotinamide du coenzyme à droite et l'histidine catalytique à gauche, le groupement carboxyl du substrat dirigé vers le bas, l'Arg171 de la L-LDH est localisée sous le pyruvate, alors que l'Arg236 de la D-LDH est située au dessus du pyruvate (figure 8).

Les positions des résidus impliqués dans l'interaction avec les groupements méthyl et carboxyl du pyruvate seraient donc simplement inversées par rapport au substrat. Au résidu Arg171 dans la L-LDH, correspondrait la Phe300 dans la D-LDH, l'Arg236 de cette dernière correspondant à la Gln102 de la L-LDH (figure 8). Ce résultat est d'autant plus intéressant que le modèle de la D-LDH a été obtenu indépendamment de la structure de la L-LDH.

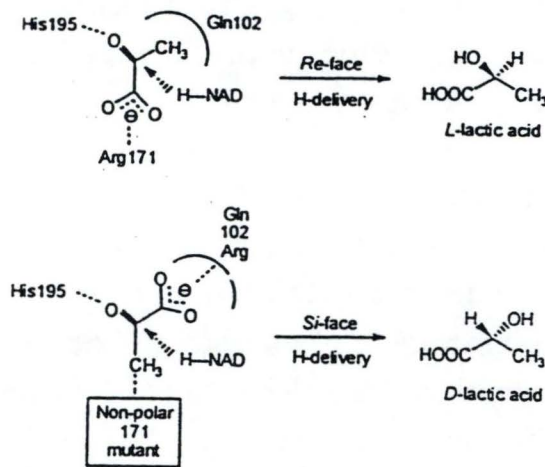


Figure 9: Stéréochimie de la réduction du pyruvate en L- ou D-lactate. Dans la L-LDH, le groupement carboxyle du pyruvate est maintenu par l'Arg171. L'ion hydrure du NADH est donc toujours transféré du même côté du carbonyle du pyruvate (*Re*-face H-delivery), et c'est donc toujours du L-lactate qui est produit. Le remplacement de la Gln102 par une arginine et de l'Arg171 par un résidu hydrophobe pourrait conduire à la formation de D-lactate car c'est le côté opposé du carbonyle du pyruvate qui serait alors présenté à l'attaque de l'ion hydrure du NADH (*Si*-face H-delivery). D'après Kallwass *et al.* (1992).

Hypothèse de travail

Sur base de l'hypothèse exposée dans l'introduction, que nous appellerons hypothèse d'inversion du substrat, et dans le but de tenter d'altérer la stéréospécificité de la L-LDH, les double mutants Q102R/R171W et Q102R/R171Y de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* ont été construits par Kallwass (39) (figure 9). Cependant, aucune activité détectable en présence de D-lactate n'a pu être mise en évidence par les auteurs. Dans le but de comprendre en quoi l'hypothèse d'inversion du substrat s'est avérée incomplète ou même fautive, la structure de ce double mutant a été modélisée au laboratoire. L'analyse de ce modèle suggère que les modifications du site actif créent un volume interne plus important, et donc plus accessible au solvant. L'augmentation du volume du site actif pourrait entraîner la multiplication de positions non-productives du substrat dans la poche de fixation. Par ailleurs, une ou plusieurs molécules d'eau pourraient s'insérer dans le site catalytique et perturber les interactions hydrophobes éventuelles entre le groupement méthyl du substrat et la Phe171, compromettant toute possibilité de positionnement du substrat compatible avec l'hypothèse d'inversion du substrat.

D'autre part, l'analyse de la poche de fixation du substrat du modèle tridimensionnel de la structure modélisée de la D-LDH de *Lactobacillus bulgaricus* (29) présente un site actif de volume plus réduit, grâce à la présence d'un "plancher hydrophobe" constitué des résidus Phe299 et Tyr101 à proximité du groupement méthyl du pyruvate (figure 8). Cette particularité structurale suggère que ces groupements aromatiques permettent de stabiliser le substrat par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes avec son groupement méthyl. Le nombre de positions que le substrat peut adopter est donc très limité par la présence de ce plancher hydrophobe.

Les structures de plusieurs mutants de la L-LDH de muscle de lapin ont été modélisées au laboratoire. L'analyse comparative des modèles de la D-LDH et du mutant L-LDH/Q102R/R171F (Figure 10) suggère que l'introduction d'un plancher hydrophobe dans un double mutant L-LDH/Q102R/R171F, analogue à celui observé dans le site actif de la D-LDH, pourrait permettre de mimer les conditions de catalyse de cette dernière. Dans le site actif de la L-LDH, le meilleur acide aminé candidat pouvant être substitué par un résidu aromatique est la Thr246. Nous avons choisi de le remplacer par un tryptophane, de façon à maximaliser la surface hydrophobe du nouveau "plancher". En effet, la très grande taille de la chaîne latérale de ce résidu permettrait de combler la cavité observée dans le site actif du double mutant L-LDH/Q102R/R171F.

L-LDH/Q102R/R171F

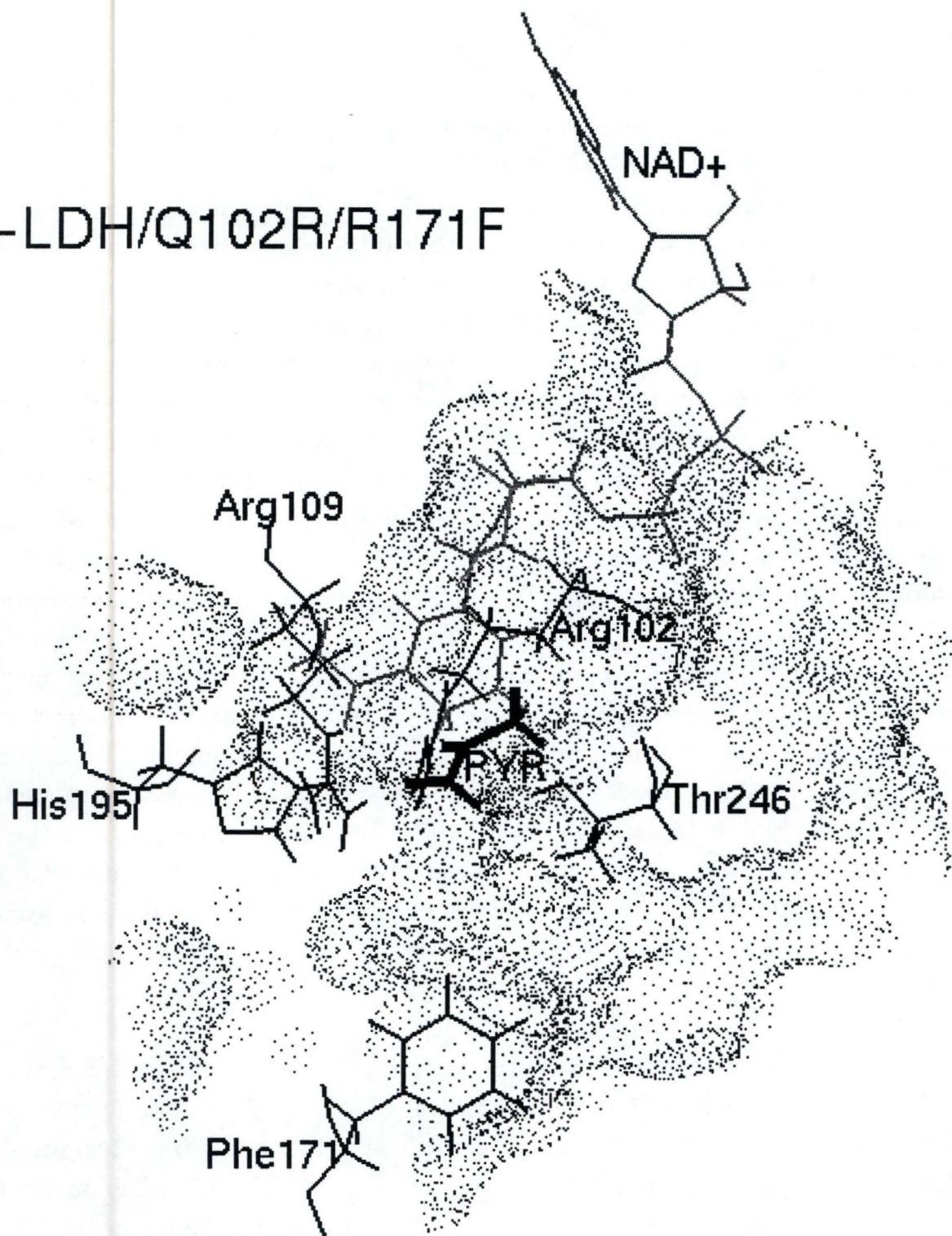


Figure 10 : Représentation du site actif du modèle de la L-LDH/Q102R/R171F.

But du travail

Actuellement, l'étude intensive des L-LDH, très bien caractérisées d'un point de vue structural et fonctionnel ne fournit toujours pas de réponse satisfaisante au problème de la compréhension de la stéréospécificité stricte des L- et D-LDH.

Ce travail est une contribution à l'étude des mécanismes assurant la stéréospécificité stricte de la L-LDH. Nous nous proposons de tenter de modifier cette stéréospécificité.

Dans ce but, nous allons participer à la première étape de la réalisation du triple mutant Q102R/R171F/T246W de la L-LDH de muscle de lapin, en utilisant le gène de cette protéine, cloné dans un plasmide d'expression, dont nous disposons au laboratoire. Cette première étape consiste en la réalisation du mutant L-LDH/T246W.

Cette mutation vise à diminuer l'espace disponible dans le site actif de l'enzyme. Combinée aux mutations Q102R et R171F, déjà réalisées au laboratoire, nous espérons obtenir un enzyme fixant le pyruvate dans une position compatible avec l'hypothèse d'inversion du substrat. L'Arg102 réaliserait un pont hydrogène avec le groupement carboxyl du pyruvate, analogue à celui réalisé par l'Arg236 dans la D-LDH. La Phe171 créerait un environnement hydrophobe autour du groupement méthyl du pyruvate.

La caractérisation biochimique du mutant L-LDH/T246W nous permettra également de mieux définir le rôle de la Thr246 dans la réaction de catalyse.

Résultats

Modélisation des structures de mutants de la L-LDH de muscle de lapin

Une modélisation de la structure de l'enzyme mutant L-LDH/T246W a été réalisée afin de vérifier que le tryptophane introduit n'entre pas en conflit avec les autres résidus impliqués dans la catalyse. Ce modèle nous permettra également de proposer une interprétation des résultats expérimentaux sur base de la relation entre structure et fonction.

La modélisation des enzymes mutants L-LDH/Q102R/R171F et L-LDH/Q102R/R171F/T246W a également été réalisée, de façon à nous permettre de

Modélisation de l'enzyme mutant L-LDH/T246W

Mécanique et dynamique moléculaire

La modélisation de la structure du mutant L-LDH/T246W a été réalisée à partir du modèle de la L-LDH de muscle de lapin. La Thr246 a tout d'abord été remplacée par un tryptophane. Une librairie de rotamères a ensuite été testée sur la chaîne latérale du Trp246. Chaque rotamère est évalué grâce à une mesure de l'énergie d'interaction (E_{int}) du résidu:

$$E_{\text{int}} = \sum_{i>j} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \sum_{i>j} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^9} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right]$$

où q_i et q_j sont les charges des atomes i et j , ϵ est la constante diélectrique, r_{ij} est la distance entre les atomes i et j , A_{ij} et B_{ij} sont des constantes propres aux atomes i et j . Une constante diélectrique égale à r a été choisie pour tous les calculs d'optimisation (40).

L'évaluation des ces énergies d'interaction montre que la conformation initiale de la chaîne latérale du tryptophane, correspondant à la conformation la plus proche de la Thr246, est la plus stable (énergie d'interaction la plus faible).

Cette nouvelle structure a ensuite été soumise à une procédure d'optimisation par étapes. L'évaluation des structures successives générées se fait d'une part en comparant les mesures d'énergie potentielle globale des structures, la valeur la plus faible possible étant préférable, et, d'autre part, les dérivées maximale et moyenne de cette fonction énergie. Une structure est jugée satisfaisante si la dérivée maximale est inférieure à $1 \text{ Kcal.mole}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$.

L-LDH/T246W

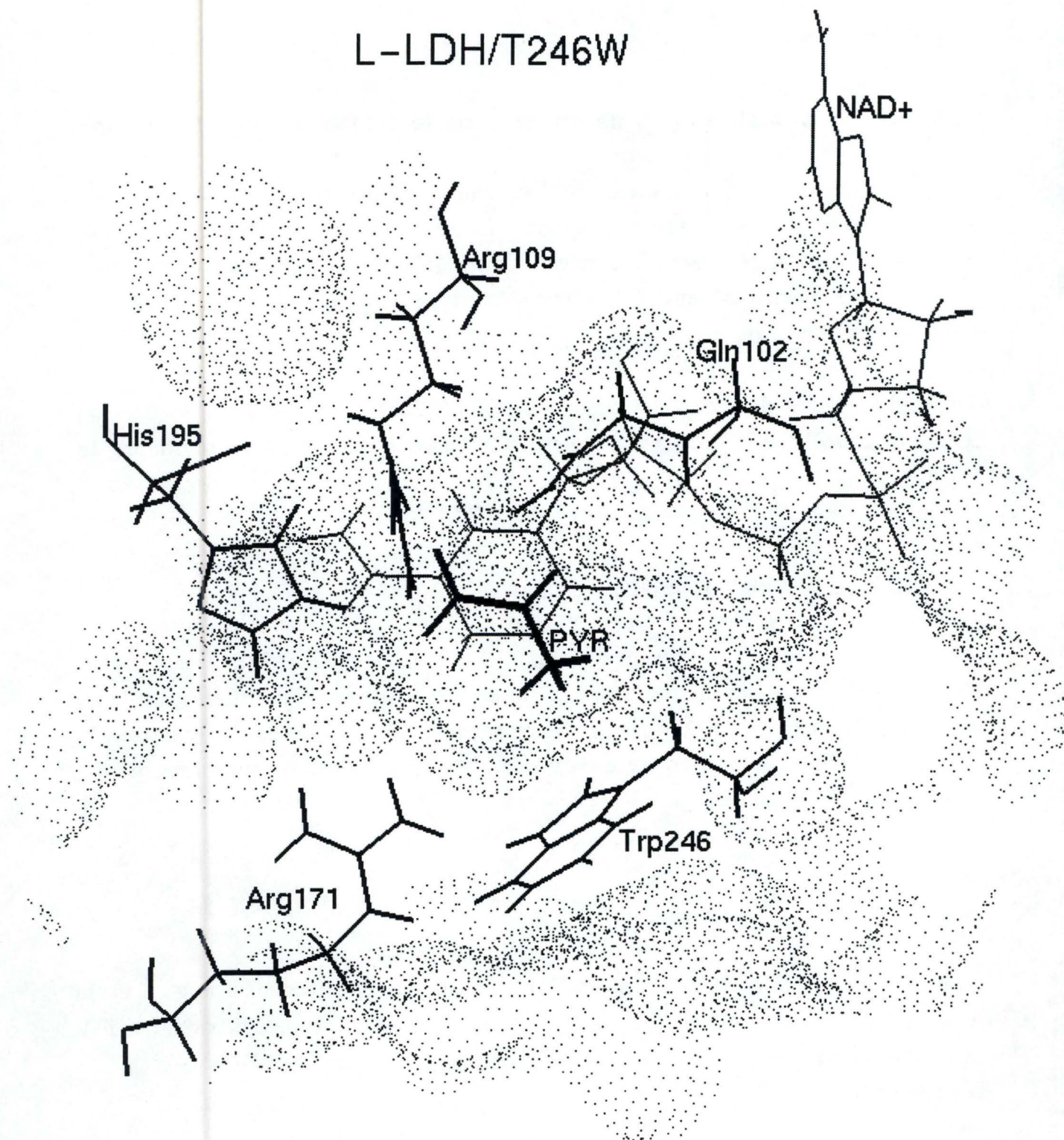


Figure 11 : Représentation du site actif du modèle de la L-LDH/T246W.

La première étape est la minimisation de l'énergie potentielle globale de la molécule. Seuls les résidus situés dans une sphère de 10 Å de rayon autour du substrat (pyruvate) ont la possibilité de bouger, les autres a.a. étant fixés dans leur position initiale. Une contrainte de position (100 Kcal/Å) a cependant été appliquée aux résidus mobiles, excepté le Trp246. La minimisation a été menée durant 1000 itérations en utilisant l'algorithme des gradients conjugués (*conjugate gradients*).

Les dérivées maximale et moyenne obtenues après minimisation de l'énergie potentielle globale sont respectivement de 9,51 et 0,457 Kcal.mole⁻¹.Å⁻¹.

Le modèle a ensuite été soumis à une procédure de dynamique moléculaire, afin d'explorer des zones de l'espace conformationnel inaccessibles par une procédure de minimisation de l'énergie; en effet, cette dernière ne permet pas de franchir d'éventuelles barrières énergétiques séparant deux minima d'énergie voisins. Cette étape permet l'obtention éventuelle de conformations alternatives intéressantes du Trp246 et de son environnement. La dynamique moléculaire est effectuée sur le groupe d'atomes de la sphère de 10Å de rayon; elle est initialisée pendant 100 itérations d'une femtoseconde chacune, soit 100 fs, à 300 K. La dynamique *senso stricto* est menée durant 10 ps à 300 K, par itérations d'une fs. L'énergie potentielle globale de la conformation obtenue à chaque ps est minimisée, et la structure qui en résulte est sauvegardée. Les conditions de la minimisation d'énergie sont les suivantes: 100 itérations par l'algorithme *steepest descents*, avec une contrainte de position de 100 Kcal/Å sur tous les atomes mobiles, excepté le Trp246. L'ensemble des structures générées est comparé, celle dont l'énergie potentielle est la plus faible est retenue; il s'agit en général de la dernière structure générée par la dynamique moléculaire.

L'énergie potentielle de cette structure est enfin minimisée plus finement en utilisant l'algorithme des gradients conjugués, pendant 1000 itérations. Les dérivées maximale et moyenne obtenues sont respectivement de 0,09 et 0,0092 Kcal.mole⁻¹.Å⁻¹. La dérivée maximale obtenue nous permet d'exclure l'existence d'in vraisemblances dans le modèle.

L'analyse de la conformation du site actif de ce modèle révèle que les résidus principalement impliqués dans la catalyse (His195, Asp168, Arg109) n'ont pas été perturbés de façon significative par l'introduction du Trp246, pourtant volumineux (figure 11).

L-LDH/Q102R/R171F/T246W

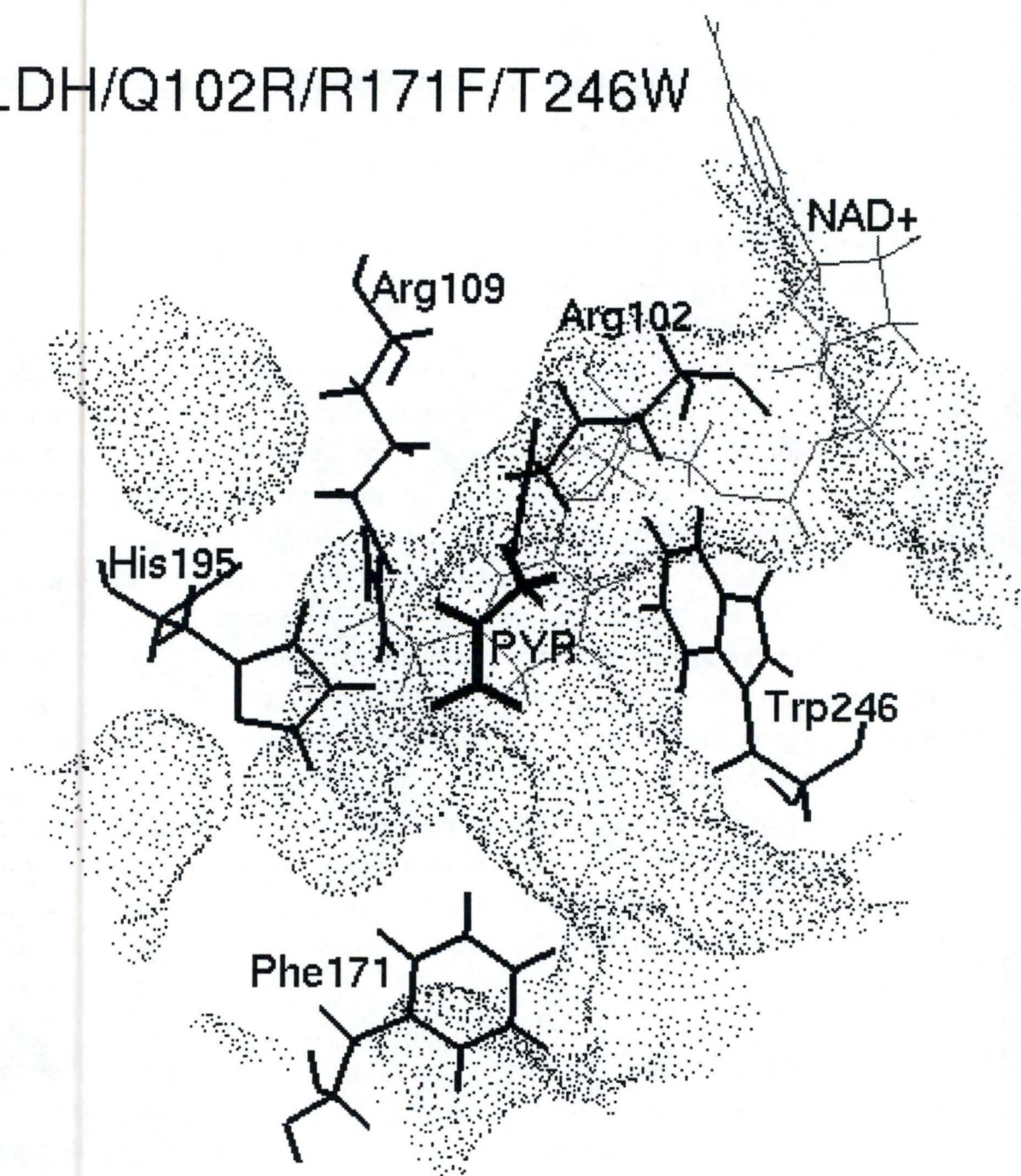


Figure 12 : Représentation du site actif du modèle de la L-LDH/Q102R/R171F/T246W.

Modélisation des enzymes mutants L-LDH/Q102R/R171F et L-LDH/Q102R/R171F/T246W

Mécanique et dynamique moléculaire

Le procédure appliquée pour la modélisation du mutant L-LDH/T246W a été également utilisée pour la modélisation des double et triple mutants L-LDH/Q102R/R171F et L-LDH/Q102R/R171F/T246W. Les rotamères des résidus Arg102, Phe171 et Thr246 dont l'énergie est minimale ont été sélectionnés pour l'élaboration du modèle initial des mutants.

L'énergie potentielle des modèles a été minimisée dans les mêmes conditions que le simple mutant T246W. La conformation issue de la minimisation a été soumise à une dynamique moléculaire. La conformation des sites actifs de ces modèles sont présentés figure 10 pour le double mutant et 12 pour le triple.

Mutagenèse dirigée pour l'obtention d'un enzyme L-LDH/T246W

Première tentative de mutagenèse dirigée

Choix de la séquence de l'oligonucléotide de mutagenèse

Le choix de la séquence de cet oligonucléotide est basé sur la séquence de la L-LDH de muscle de lapin (10) insérée dans le phage M13LDH646, décrit dans la section matériel et méthodes. La séquence du phage M13LDH646 à proximité du codon de la thréonine 246 est la suivante :

-5' -CAAGCTGAAGGGCTAC**ACT**ACCTGGGCCATTG-3' -

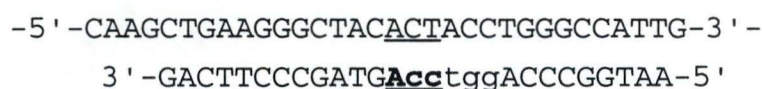
Dans cette séquence, la thréonine 246 est codée par le triplet '**ACT**'.

Le remplacement de la thréonine 246 par un tryptophane nécessite la synthèse de l'oligonucléotide suivant :

3' -GACTTCCCGATG**Acc**tggACCCGGTAA-5' -

Il est composé de 27 nucléotides et son extrémité 5' est non phosphorylée. Les zones de non-appariement (ou *mismatches*) sont situées au milieu de l'oligonucléotide. Le T_m de l'oligonucléotide est de 86°C (T_m : température à laquelle 50% de l'oligonucléotide est apparié = $4(G+C) + 2(A+T) - 3$).

Il y a trois bases non-appariées (représentée en gras), lors de l'hybridation de l'oligonucléotide sur l'ADN simple brin du phage.



Cet oligonucléotide permet de plus d'introduire un site de restriction pour l'enzyme *Ava* II (G/GWCC où W représente n'importe quelle base) représenté en minuscule.

Production du vecteur de mutagenèse

La transfection de la souche *E. coli* TG1 par le phage M13LDH646 a permis l'obtention d'environ 10 µg du phage double brin et de 60 µg d'ADN simple brin.

Réaction de mutagenèse dirigée

Une réaction de mutagenèse dirigée a été réalisée sur le vecteur de mutagenèse, conformément au protocole décrit dans le chapitre "Méthodes", avec l'oligonucléotide décrit ci-dessus. En parallèle, un contrôle positif a été réalisée (fourni par la firme). 300 µl de cellules de la souche *E. coli* TG1 compétentes au CaCl₂ ont été transformés par 10 et 5 µl du produit final des réactions.

Une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % des échantillons prélevés durant la réaction a permis de contrôler le niveau de l'efficacité de mutagenèse.

Le profil de migration de ces échantillons s'est avéré satisfaisant, augurant d'un taux de mutagenèse acceptable.

Analyse du contrôle positif de mutagenèse

Une estimation plus précise du taux de mutagenèse est réalisée avec le contrôle positif. Ce contrôle permet de restituer un phénotype 'bleu', dû à l'alpha complémentation de la β-galactosidase dans la souche ayant incorporé l'ADN portant la mutation contrôle. A cet effet, 12 cultures de 5 ml de milieu LB contenant du X-Gal et de l'IPTG, furentensemencées avec 50 µl de préculture de la souche *E. coli* TG1. Après 4 heures de croissance à 37°C, chaque culture a été infectée une nuit par une plage de lyse obtenue avec le contrôle de mutagenèse.

La présence dans 5 des 12 cultures d'une coloration bleutée a permis d'estimer le taux de mutagenèse pour le contrôle à environ 50 %.

Tentative d'isolement de mutants

Un taux de mutagenèse proche de 50 % permet d'estimer à plus de 90 % la probabilité de détecter un clone mutant lorsque 4 clones de phages issus de la réaction de mutagenèse sont séquencés.

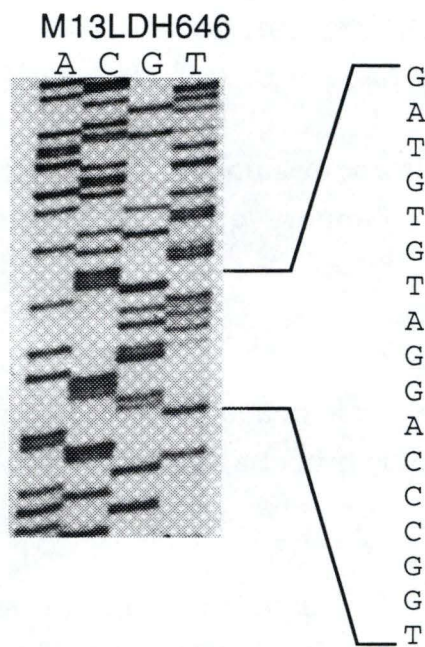


Fig. 13a : Séquence M13LDH646

Séquence de référence :	5' -CTACAC <u>CTA</u> CCTGGG-3'
Structure primaire :	ThrThr
Oligonucléotide :	5' -CTACAC <u>AT</u> CCTGGG-3'
Structure primaire :	TrpThr
Séquence obtenue :	5' -CTACAC <u>AT</u> CCTGGG-3'
Structure primaire :	ThrSer

Figure 13b : Séquence et structure primaire de référence, corrigée et induite par l'oligonucléotide de mutagenèse. Les nucléotides soulignés codent pour la thréonine 246, ceux en caractères gras correspondent à l'erreur détectée. Le site *Ava* II est représenté en italique. Cette inversion de deux bases est partiellement muette, ACT et ACA codant pour une thréonine. Par contre, le résidu 247 est une sérine et non une thréonine.

Une préparation d'ADN simple brin de 4 clones choisis aléatoirement est donc réalisée, suivie d'une réaction de séquençage.

Cette réaction a permis de détecter une erreur dans la séquence du gène de la L-LDH utilisée comme référence pour le choix de l'oligonucléotide.

Après réalisation de 4 autres réactions de séquençage sur des clones de phages issus de la mutagenèse ainsi que sur le phage sauvage (Fig. 13a), confirmant l'erreur détectée, une seconde réaction de mutagenèse avec un nouvel oligonucléotide est envisagée. En effet, non seulement un non-appariement supplémentaire est introduit, diminuant l'efficacité de la mutagenèse, mais de plus, cet oligonucléotide induit la modification de deux acides aminés. La thréonine 246 est modifiée en tryptophane et la sérine en position 247 en thréonine (Fig. 13b).

Seconde tentative de mutagenèse dirigée

Choix de la séquence du second oligonucléotide de mutagenèse

Sur base de la séquence corrigée, un second oligonucléotide est synthétisé. Celui-ci induit toujours le remplacement du codon de la thréonine 246 par celui d'un tryptophane, avec maintien du nouveau site de restriction de l'enzyme *Ava* II, mais de plus, la modification d'une base supplémentaire a permis l'ajout d'un site de restriction pour l'enzyme *Rsa* I (GT/AC).

Le second oligonucléotide synthétisé est le suivant :

3' - GTTCGACTTCCCcatgAccaggACCCGGTAA - 5'

Dans cette séquence, les 4 nucléotides en gras sont ceux créant un non-appariement lors de l'hybridation de l'oligonucléotide sur l'ADN phagien. Les bases soulignées introduisent un tryptophane en position 246, celles en minuscules représentent les sites *Rsa* I et *Ava* II.

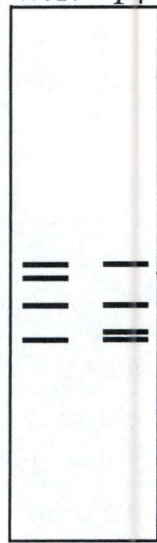
Cet oligonucléotide est composé de 31 nucléotides et son extrémité 5' est non phosphorylée. Les zones de non-appariement sont situées au milieu de l'oligonucléotide, celui-ci est plus riche en C, G (18) qu'en A, T (13). Le T_m a été calculé pour chaque moitié de l'oligonucléotide, étant donné le nombre relativement important de non-appariements créés dans la partie centrale. Les T_m de ces moitiés sont tout deux de 35°C.

Réaction de mutagenèse dirigée

Une réaction de mutagenèse dirigée conforme au protocole décrit dans le chapitre "Méthodes" a été réalisée sur le vecteur de mutagenèse avec le nouvel oligonucléotide. La transformation des cellules compétentes au $CaCl_2$ est

Représentation
de la restriction
par *Rsa* I

W.T. 14



Tailles *Rsa* I
(pb) W.T. 7 λ

23130
9416
6557
4361

2322
2027

1334
1183
1004
823
742



Ava II Tailles
(pb) W.T. 7 λ

7871
7280

N. R.

591

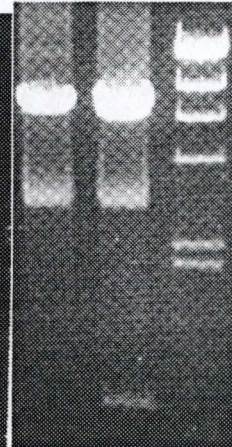


Figure 14 : Restriction *Rsa* I et *Ava* II du phage M13LDH646 sauvage et de la préparation 7
La bande située au milieu du gel dans la restriction par *Ava* II est constituée de phage non restreint.

également identique. De la même façon, une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % des échantillons prélevés durant la réaction a permis de contrôler l'efficacité de la mutagenèse.

Ce contrôle s'est avéré satisfaisant.

Tentative d'isolement de phages mutants

Une préparation de petites quantités d'ADN double brin de 10 clones de phages issus de la réaction de mutagenèse est réalisée.

La recherche de mutants parmi les différents clones est menée à bien grâce à la différence de profil de restriction par l'enzyme *Ava* II sur gel d'agarose 1,2 %.

La restriction du phage M13LDH646 par l'enzyme *Ava* II présente sur gel deux bandes de 7280 et de 591 pb. Le site supplémentaire introduit par mutagenèse permet la restriction de cette dernière en deux bandes de 450 et de 141 pb.

De façon inattendue, la plupart des préparations restreintes ne présentent qu'une bande aux environs de 7800 pb. Une préparation restreinte sur huit, préparation 7, présente deux bandes d'environ 7200 et 600 pb (Fig. 14).

Une nouvelle erreur dans la séquence de référence a donc été mise en évidence. Il n'y a qu'un seul site de restriction par *Ava* II dans la phage M13LDH646 sauvage. Les mutations apportées par le deuxième oligonucléotide de mutagenèse en ajoute un second.

Cela ne modifiait en rien les conditions de mutagenèse.

Une confirmation de ces affirmations a été réalisée par une restriction de ces mêmes préparations par l'enzyme *Rsa* I.

La restriction par l'enzyme *Rsa* I du phage sauvage présente un profil sur gel d'agarose de 20 fragments dont les plus importants sont composés de 1334, 1183, 1004, 758 et 742 pb. Les mutations introduites permettent la restriction de la bande de 1183 en deux de 823 et 360 pb.

Le profil de restriction *Rsa* I de nos préparations correspond parfaitement à ces prévisions. La seule préparation montrant le profil mutant étant la préparation 7 (Fig. 14).

Ces mutations ont ensuite été vérifiées par une réaction de séquençage sur la préparation en petites quantités d'ADN double brin (Fig. 15). Ce vecteur a été appelé M13LDH646m.

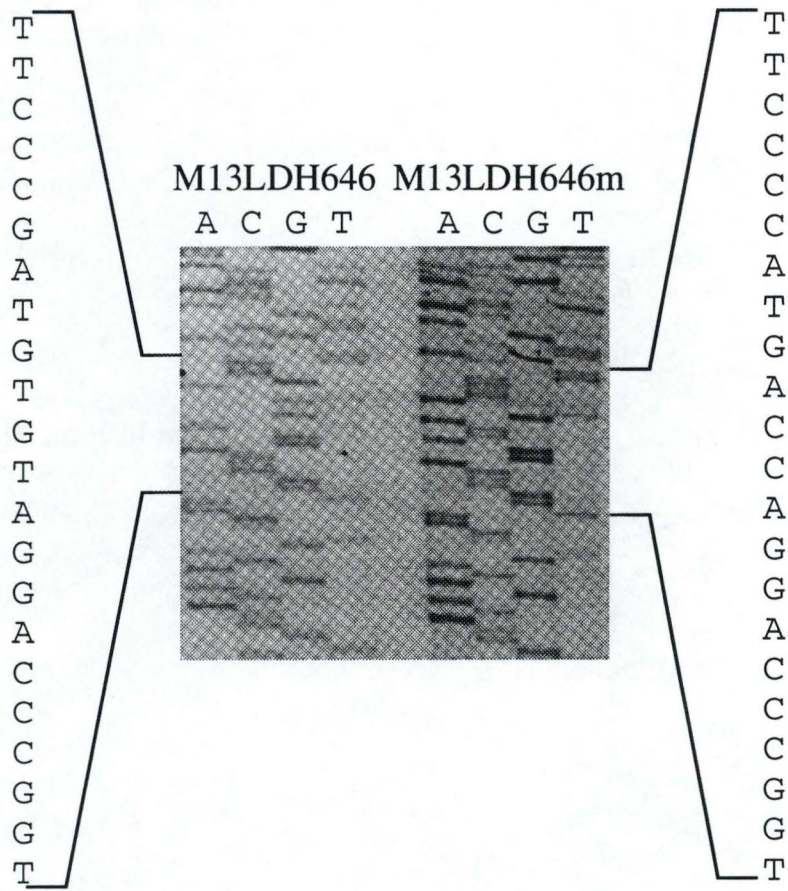


Figure 15 : Séquences des phages M13LDH646 et M13LDH646m

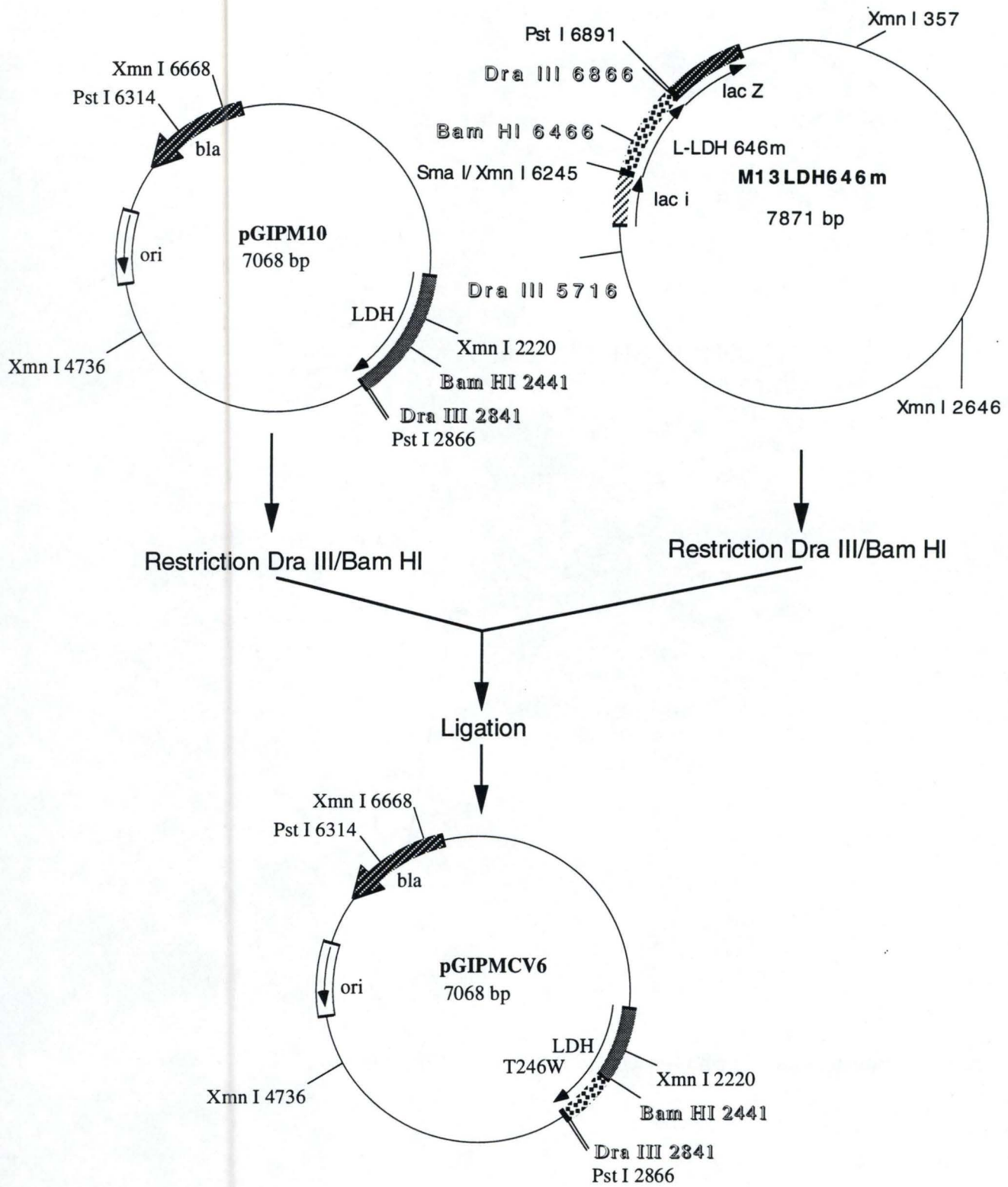


Figure 16 : Construction du vecteur pGIPMCV6. Les sites de restriction utilisés sont en ombrés.

Préparation en grande quantité du phage portant les mutations (M13LDH646m)

Une infection de la souche *E. coli* TG1 avec le surnageant obtenu durant la préparation du phage sélectionné a permis d'obtenir 45 µg d'ADN double brin du vecteur portant les mutations T246W.

Construction du vecteur d'expression de la L-LDH/T246W

Le plasmide pGIPM10 a été choisi pour l'expression de la protéine L-LDH/T246W. Ce plasmide, construit par P. Mertens (41), permet une surproduction de la L-LDH estimée à près de 10%.

Une double restriction du plasmide pGIPM10 par *Dra* III et *Bam* HI génère deux fragments de 6668 et de 400 pb. Le fragment de 6668 pb sera appelé matrice. La même double restriction du phage M13LDH646m génère trois fragments. Le plus important, de 6721 pb est flanqué de deux bouts collants *Dra* III et ne peut donc pas s'insérer dans la matrice du plasmide pGIPM10. Les deux fragments restants sont composés de 400 et de 750 pb, le plus petit étant porteur des mutations. Ces deux fragments sont flanqués de bouts collants *Dra* III et *Bam* HI, ce qui permet de les insérer dans la matrice du plasmide (Fig. 16).

Production du vecteur d'expression pGIPM10

La transformation de la souche *E. coli* TG1 par le plasmide pGIPM10 a permis la préparation de 20 µg du vecteur d'expression.

Construction de pGIPMCV6

La double restriction *Dra* III/*Bam* HI a été réalisée sur environ 800 ng du plasmide pGIPM10 et 2,4 µg du phage M13LDH646m.

Environ 50 ng de plasmide et 250 ng de phage doublement restreints ont été ligués. Etant donné les tailles des fragments, en mettant en présence 5 fois plus de phage que de plasmide, nous essayons d'ajuster le nombre de fragments et de matrice.

La souche *E. coli* AR58 a été transformée par électroporation par le produit de la ligation (par 60 et 30 ng).

Sélection et isolement du vecteur d'expression pGIPMCV6

La préparation de petites quantités de plasmide de 30 clones issus de la transformation a permis d'obtenir environ 500 ng par clone. La sélection d'éventuels plasmides porteurs des mutations a été réalisée en utilisant l'enzyme *Rsa* I. Le plasmide sauvage restreint par cet enzyme présente un profil de restriction sur gel d'agarose dont les 4 bandes principales sont d'une taille de 2772, 1924, 1565 et 807 pb. La mutagenèse dirigée réalisée génère un site de restriction *Rsa*

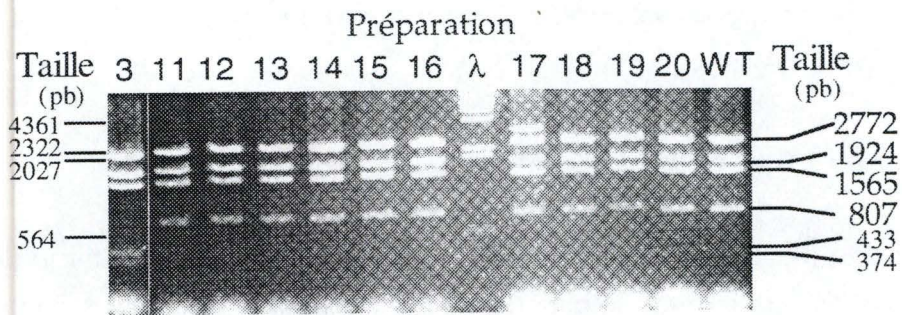


Figure 17 : Restriction *Rsa I*

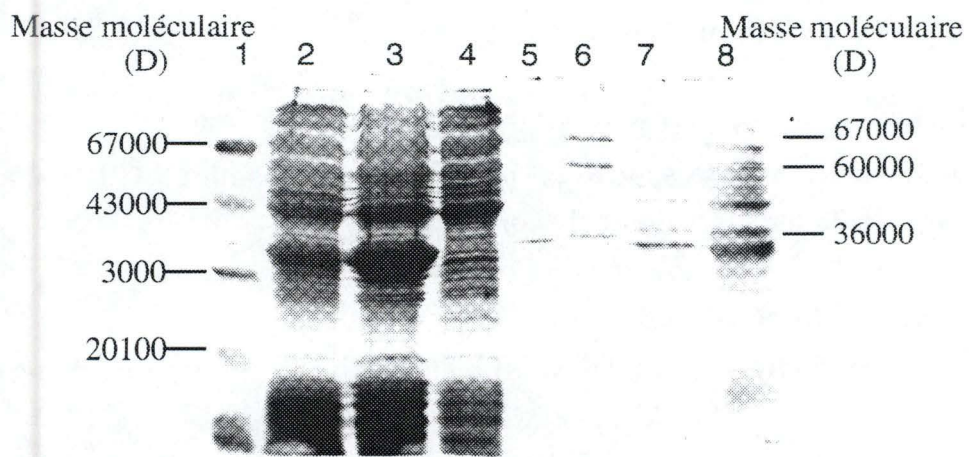


Figure 18 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire; 2 : phase soluble du lysat cellulaire brut (l. c. b.) pGIPM10; 3 : l. c. b. pGIPMCV6; 4 : l. c. b. pOTSNCO12; 5 : L-LDH de muscle de lapin commerciale; 6 : Marqueur de poids moléculaire; 7 : phase insoluble du l. c. b. pGIPM10; 8 : phase insoluble du l. c. b. pGIPMCV6

I supplémentaire. La bande de 807 paires de bases est alors scindée en 2 plus petites de 433 et 374 pb.

Sur 30 préparations effectuées, seule la préparation 3 était porteuse du fragment muté (Fig. 17).

Préparation du plasmide pGIPMCV6

Environ 50 et 25 ng de l'ADN préparé pour la sélection ont été utilisés pour transformer des cellules électrocompétentes de la souche *E. coli* AR58. Le produit de la transformation a permis de préparer 60 µg du vecteur d'expression de la L-LDH mutée. Ce plasmide a été appelé pGIPMCV6.

Le plasmide pGIPMCV6 a été transformé dans la souche *E. coli* AR58.

Caractérisation de l'enzyme L-LDH/T246W

Surproduction de l'enzyme sauvage et mutant

Des cultures en milieu liquide de colonies des souches *E. coli* AR58 porteuses des plasmides pGIPMCV6, pGIPM10 et pOTSNCO12 ont été effectuées, suivies d'une récupération des culots cellulaires et de leur disruption par sonication.

Un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes du lysat cellulaire brut a permis de vérifier la surproduction de la protéine mutante. Le contrôle négatif utilisé est le plasmide pOTSNCO12, équivalent aux plasmides pGIPM10 et pGIPMCV6 sans le gène codant pour la L-LDH. Le contrôle positif est le plasmide pGIPM10.

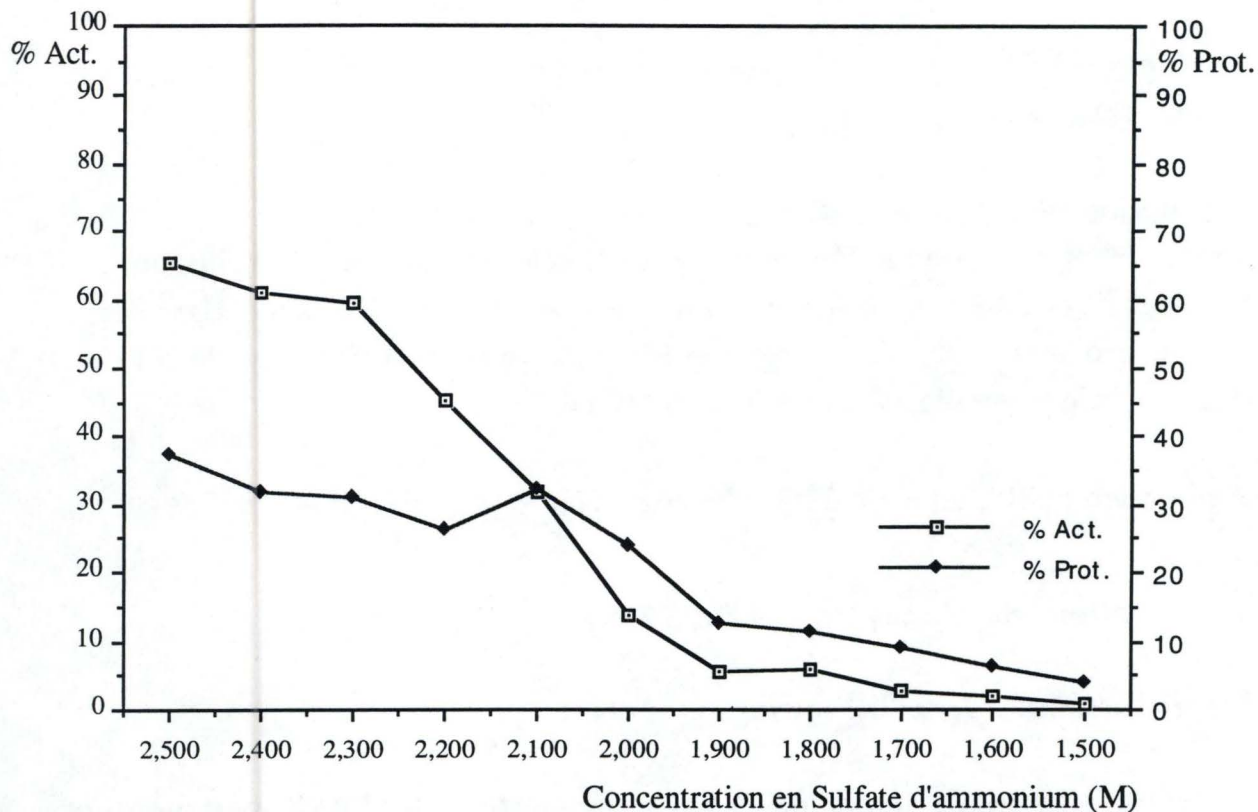
D'autre part, l'électrophorèse en conditions dénaturantes des extraits cellulaires non solubles des cultures a permis de vérifier la présence d'une majorité de L-LDH dans la phase soluble du lysat (figure 18).

Purification

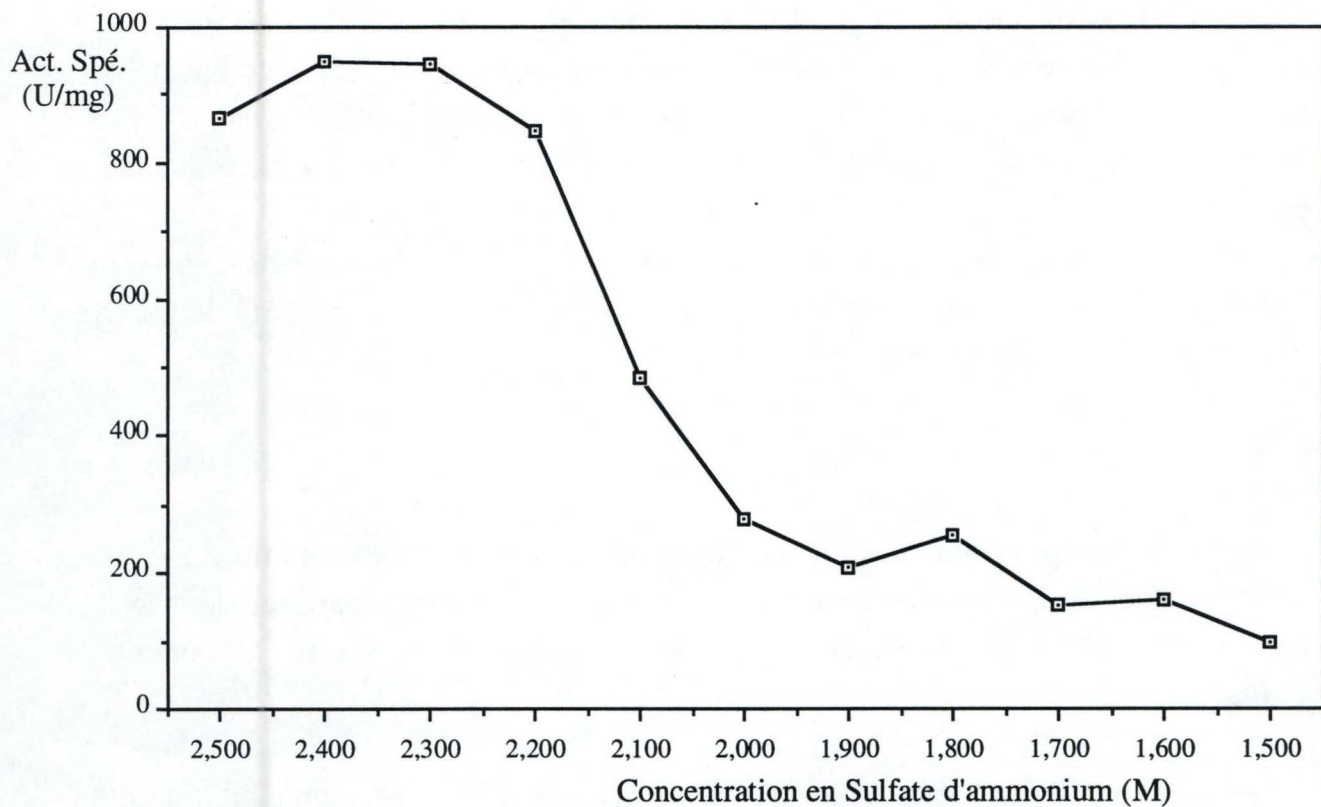
Précipitation fractionnée

Préalablement à la purification par chromatographie, une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium nous a permis de purifier partiellement les protéines L-LDH et L-LDH/T246W. La mise au point a été réalisée sur la protéine sauvage.

Les mesures de l'activité réductrice de l'enzyme avant et après précipitation ont été réalisées à pH 6,5, à une concentration finale de 5 mM en pyruvate, et 0,2 mM en NADH. Une mesure de la concentration en protéines a été réalisée avant et



Graphique 1 : Précipitation au sulfate d'ammonium. Activité et concentration en protéines .



Graphique 2 : Précipitation au sulfate d'ammonium. Activité spécifique (U/mg)

après précipitation (graphique 1). Les mesures d'activité et de concentration en protéines avant précipitation ont servi de référence (100%).

Les rapports de l'activité sur la concentration en protéines (graphique 2) représentent l'activité spécifique, en U/mg.

Un maximum d'activité spécifique a été détecté à 2,4 M en sulfate d'ammonium, concentration qui a été utilisée pour les précipitations fractionnées suivantes.

Chromatographie

L-LDH

La mise au point des conditions de purification a tout d'abord été réalisée sur l'enzyme L-LDH sauvage.

Une première colonne d'affinité a été utilisée. La colonne HiTrap Blue, contenant un analogue du NADH, le Cibacron Blue 3G-A, permet de fixer uniquement les enzymes ayant une affinité pour le dinucléotide. L'élution par un gradient de NaCl et de NADH décroche séquentiellement les différentes protéines. La détermination précise du volume d'élution de la L-LDH a été réalisée par une mesure de l'activité de réduction du pyruvate. Une telle activité a été détectée à un volume d'élution équivalent à l'intervalle 61 à 80 minutes (figure 19a). Un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes de l'ensemble des fractions prélevées n'a pas permis de détecter la présence de L-LDH en dehors de cet intervalle.

Le volume recueilli a été précipité au sulfate d'ammonium et le précipité resuspendu est injecté sur tamis moléculaire (superose 12HR).

L'enzyme L-LDH pure est éluée du tamis moléculaire à 22 minutes (figure 19b). Sa pureté appréciée par une électrophorèse en conditions dénaturantes a été estimée à plus de 95% (figure 20).

L-LDH/T246W

Les conditions de purification optimisées sur la protéine sauvage ont été utilisées pour purifier la L-LDH mutée. La mutation induite dans la protéine n'a apparemment pas influé sur les paramètres de purification, puisque la présence de protéine mutante n'a pas été détectée dans les fractions ne correspondant pas aux intervalles d'élution définis pour la protéine sauvage. Cette détection a été réalisée par électrophorèse en conditions dénaturantes. L'élution de la L-LDH/T246W, par chromatographie sur tamis moléculaire, à 22 minutes, confirme l'état tétramérique de la protéine mutante (figure 21).

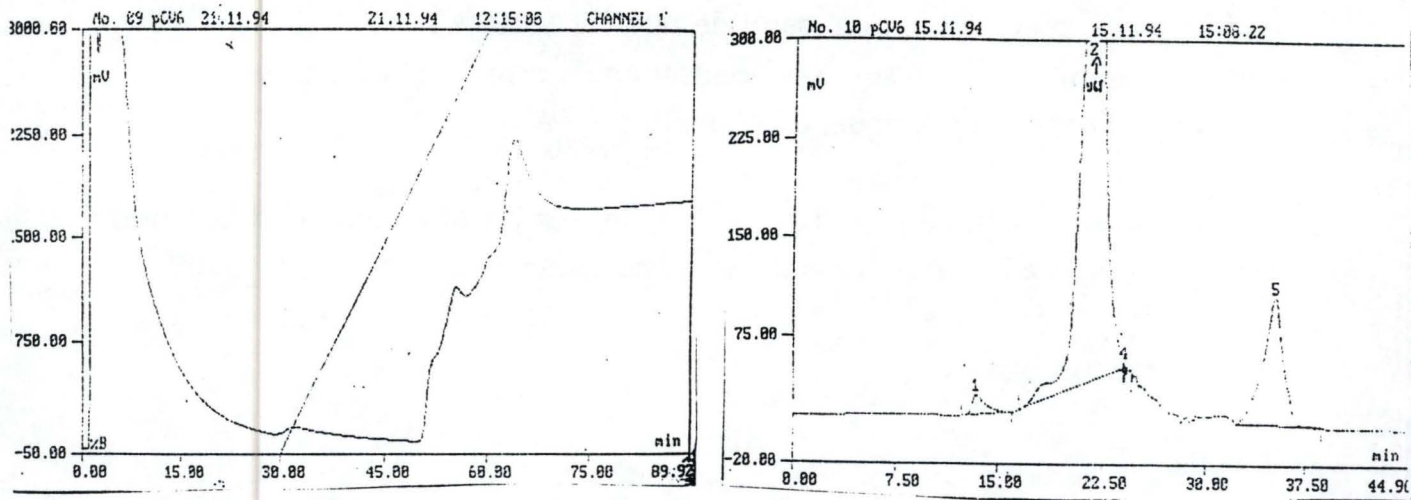


Figure 19 : Chromatogramme de purification de la L-LDH obtenu avec HiTrap Blue (a) et Superose 12 HR (b).

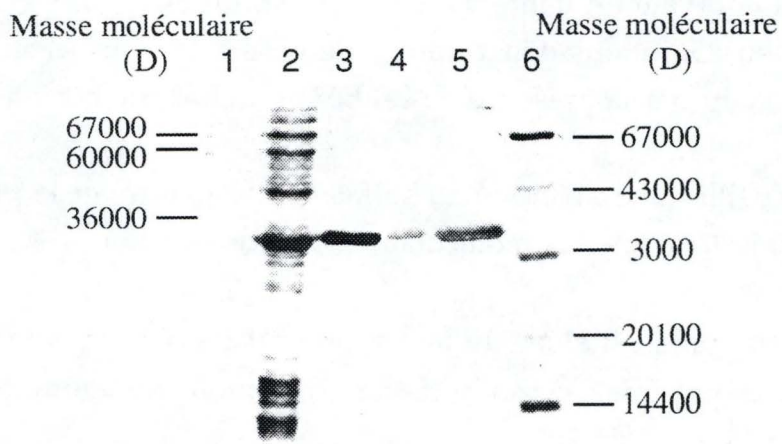


Figure 20 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Piste 1 : marqueur de poids moléculaires; 2 : Lysat cellulaire brut pGIPMCV6; 3 : L-LDH/T246W purifié; 4 : L-LDH commerciale; 5 : L-LDH purifié; 6 : marqueur de poids moléculaires

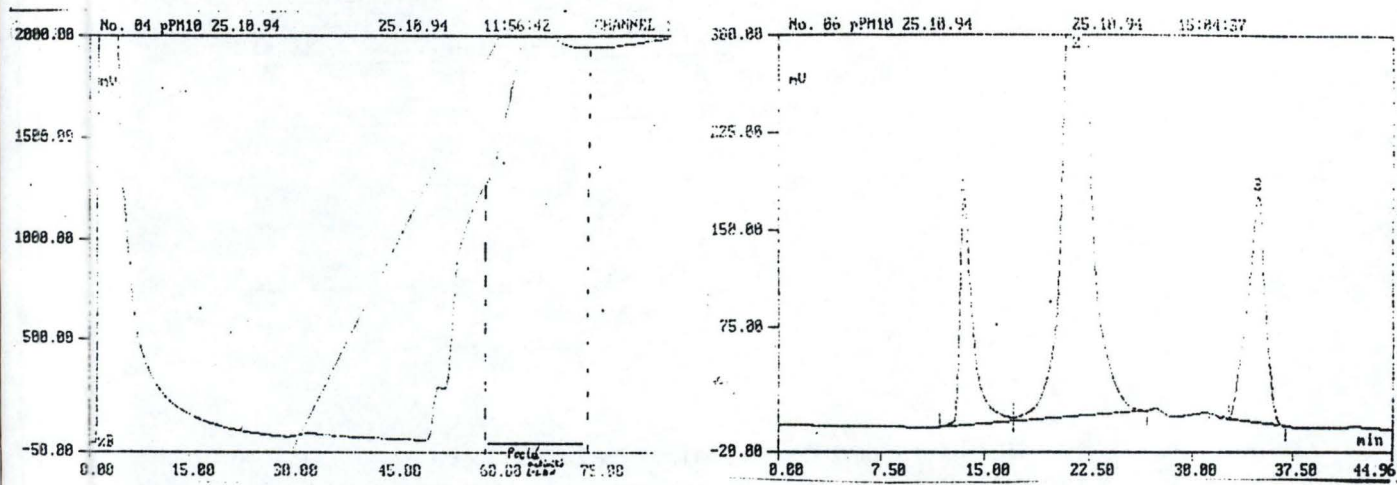
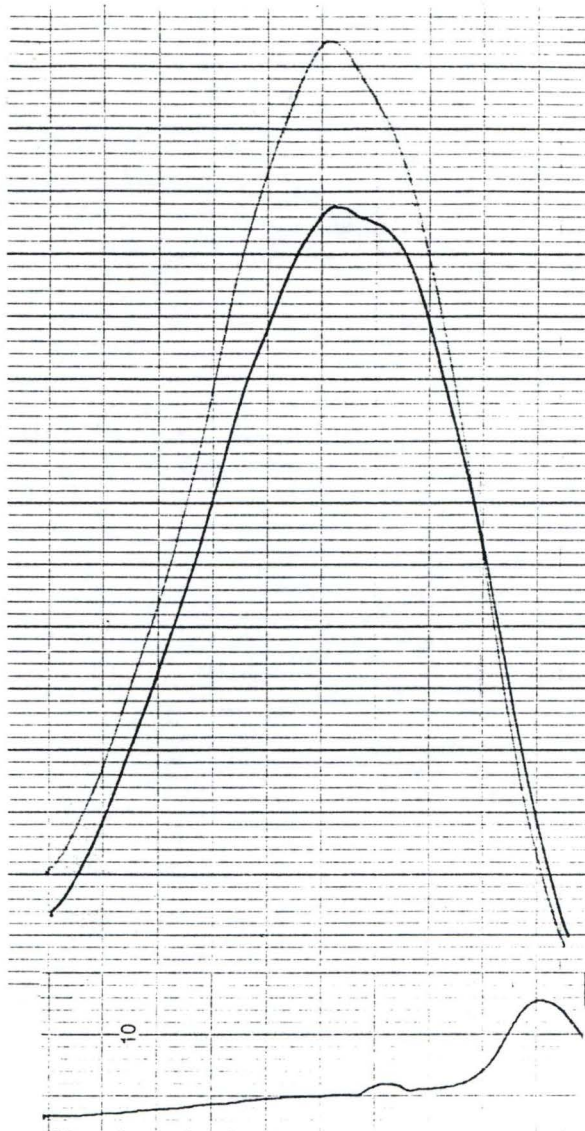
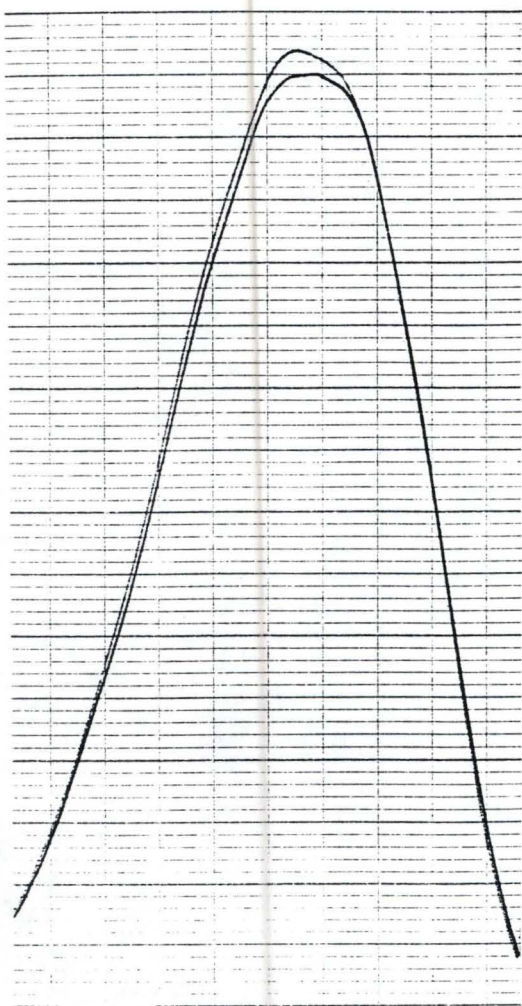
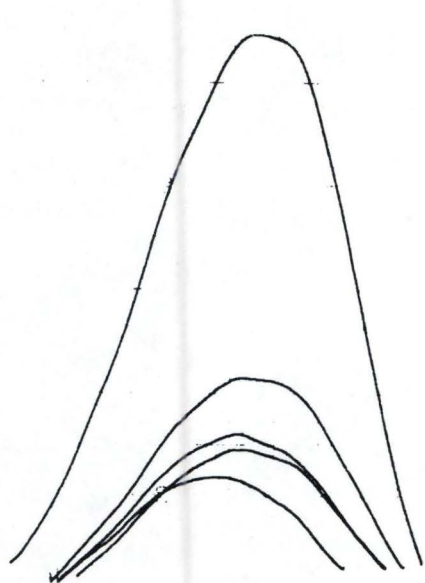


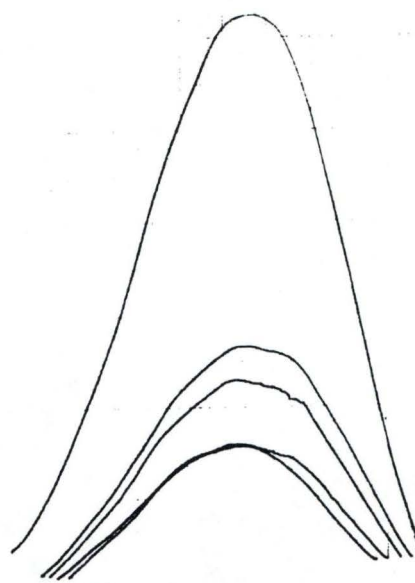
Figure 21 : Chromatogramme de purification de la L-LDH/T246W obtenu avec HiTrap Blue (a) et Superose 12 HR (b).



Tracé 1 : a : Spectre de fluorescence des protéines L-LDH et L-LDH/T246W à même intensité; b: à même concentration en protéines, le spectre du tampon est également représenté.



L-LDH



L-LDH/T246W

Tracé 2 : Spectre de fluorescence des protéines L-LDH et L-LDH/T246W pures en présence de guanidinium en concentrations de 0; 1; 1,5; 2 et 3 M

De même que pour la protéine sauvage, une électrophorèse en conditions dénaturantes de la fraction recueillie a permis d'estimer sa pureté à plus de 95% (figure 20).

Fluorescence

Modifications structurales

L'émission de fluorescence entre 300 et 400 nm d'une protéine excitée à une longueur d'onde de 278 nm permet d'évaluer la stabilité et l'intégrité de sa structure.

La comparaison de mesures de fluorescence réalisées sur les protéines sauvage et mutante purifiées a permis d'évaluer les changements structuraux éventuels causés par la mutation.

Les premiers tracés ont été réalisés à une même concentration en protéines (tracé 1b).

La différence d'intensité de ces tracés est attribuée au tryptophane ajouté dans la protéine. En effet, seuls les a.a. à groupements aromatiques sont responsables de l'émission de fluorescence dans une protéine .

Les concentrations protéiques ont ensuite été modifiées pour amener les maxima d'intensité à un même niveau. La similarité des tracés a permis de tirer la conclusion qu'aucune différence structurale n'a pu être détectée par cette méthode (tracé 1a).

Modifications de la stabilité

Des mesures de stabilité ont été réalisées à des concentrations en protéines donnant des tracés de même intensité. Les solutions de protéines ont été incubées 15 minutes sur glace en présence de guanidium (agent chaotropique) à des concentrations croissantes (0, 1, 1,5, 2 et 3 M). L'incubation sur glace permet d'atteindre un état d'équilibre, où le dépliement des protéines est optimal pour une concentration en guanidium donnée. La similarité des deux tracés (tracé 2) permet de conclure qu'aucune différence de stabilité en présence de guanidium n'est détectée par cette méthode.

Cinétiques

Activité réductrice des enzymes L-LDH et L-LDH/T246W

Des mesures d'activité enzymatique dans le sens de la réduction du pyruvate en lactate ont été réalisées sur la protéine mutante pure.

Les conditions optimales de pH et de concentration en NADH ont été déterminées. A cet effet, l'activité enzymatique a été testée à quatre pH (5,5; 6,0; 6,5 et 7,0), en présence de 1 mM de pyruvate et de 0,2 mM de NADH. Le pH optimum

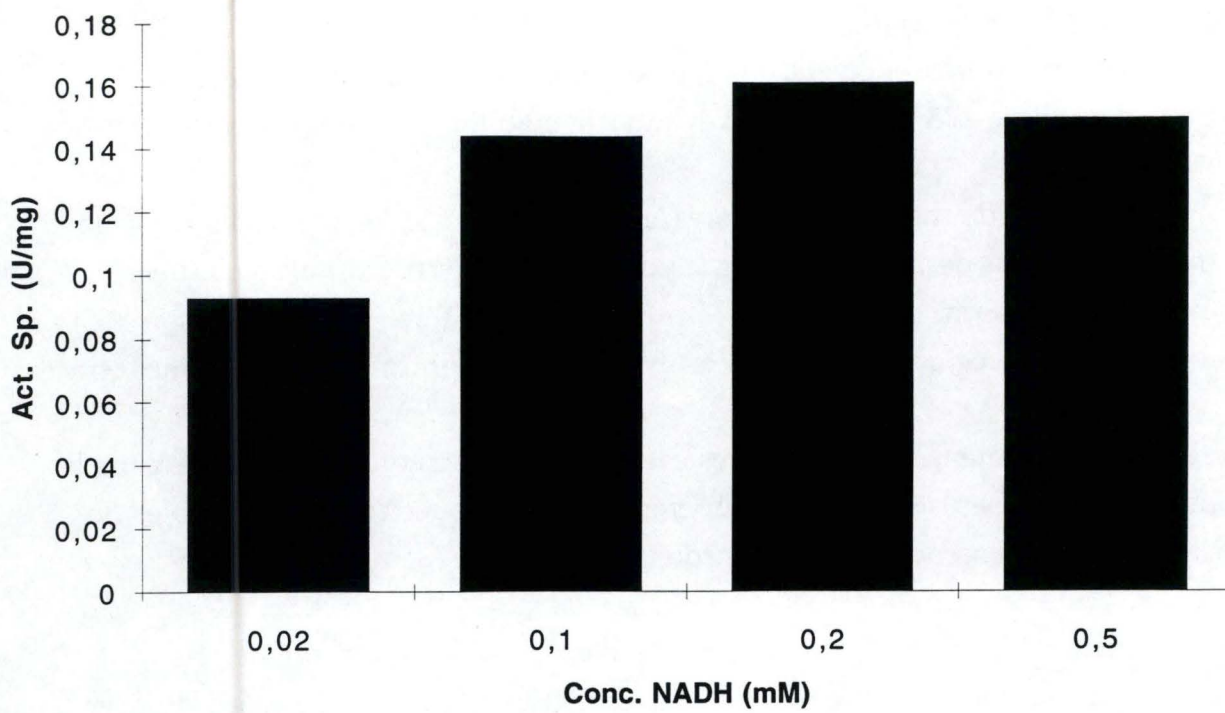


Figure 22 : Activité d'oxydation du pyruvate par l'enzyme L-LDH/T246W à pH 6,5 et 1 mM en pyruvate.

déduit de cette expérience est de 6,5. Cette valeur est en parfait accord avec les données précédemment obtenues au laboratoire.

L'activité enzymatique a également été mesurée à pH 6,5 en présence de concentrations croissantes en NADH (0,02; 0,1; 0,2 et 0,5 mM) (fig. 22), et de 1 mM de pyruvate. L'activité atteint un plateau à environ 0,2 mM en NADH. Une concentration en NADH de 0,2 mM a donc été choisie lors des expériences suivantes.

La dépendance de l'activité enzymatique (vitesse initiale) vis-à-vis de la concentration en pyruvate a donc été mesurée en présence de 0,2 mM de NADH, à pH 6,5. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 2 et dans le graphe 3. Aux concentrations modérément élevées en pyruvate (1 à 10 mM), on observe une nette diminution de l'activité enzymatique. La prise en considération d'une inhibition par le substrat s'est donc révélée nécessaire, conformément aux données de la littérature (42).

La détermination des constantes cinétiques de l'activité réductrice de l'enzyme a été réalisée par une régression non linéaire (logiciel BMDP) selon l'équation (42):

$$v=V_{max}.S/(K_M+S+S^2/K_I)$$

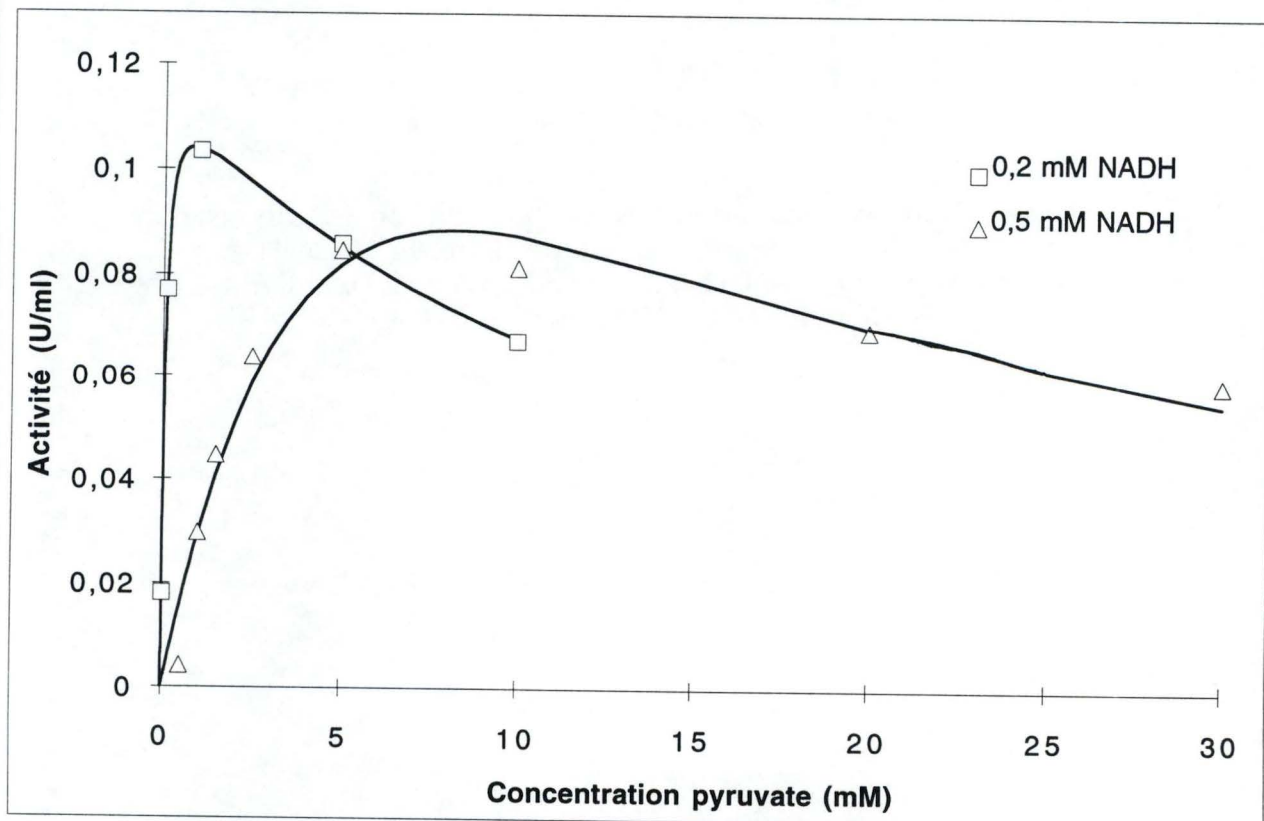
Dans cette équation, v représente l'activité (en U/mg), V_{max} la vitesse maximale (en U/mg), S la concentration en pyruvate (en mM), K_M la constante cinétique d'affinité (en mM) et K_I la constante d'inhibition (en mM). Notons que l'efficacité catalytique faible ne nous a pas permis de réaliser des réplicats de ces mesures, la quantité d'enzyme pur disponible étant limitée.

Les constantes cinétiques déterminées par cette équation sont reprises dans le tableau 2, ainsi que les constantes cinétiques de la protéine sauvage, déterminées précédemment au laboratoire, à l'exception de la constante d'inhibition K_I .

En présence de 1 mM en pyruvate, l'activité spécifique de l'enzyme L-LDH/T246W a une concentration en NADH de 0,2 mM est supérieur à celle observée pour une concentration en NADH de 0,5 mM. Cependant, si le même test est effectué en présence de 10 mM de pyruvate, on constate une activité plus élevée en présence de 0,5 mM en NADH par rapport à celle observée à 0,2 mM en NADH. La dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis de la concentration en pyruvate a donc également été mesurée en présence de 0,5 mM de NADH, à pH 6,5. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 et dans le graphe 3.

0,2 mM NADH	L-LDH/T246W	L-LDH	WT/mutant
KM (mM)	0,052	0,095	1,82692308
Vmax (U/mg)	0,117	52,86	451,794872
Kcat (s-1)	0,071	32,07	451,690141
Ki (mM)	13,831		
Kcat/KM	1,36538462	337,578947	247,240919
(s-1 mM-1)			
0,5 mM NADH	L-LDH/T246W	L-LDH	WT/mutant
KM (mM)	9,551	0,095	0,0099466
Vmax (U/mg)	0,307	52,86	172,18241
Kcat (s-1)	0,0195	32,07	1644,61538
Ki (mM)	6,502		
Kcat/KM	0,00204167	337,578947	165344,437
(s-1 mM-1)			

Tableau 2 : Constantes cinétiques de réduction du pyruvate par la L-LDH/T246W à pH 6,5 et à des concentrations de 0,2 et 0,5 mM en NADH. Les constantes de la L-LDH sont celles de déterminées précédemment au laboratoire.



Graph 3 : Cinétiques de réduction du pyruvate par la L-LDH/T246W à pH 6,5 et à des concentrations de 0,2 et 0,5 mM en NADH.

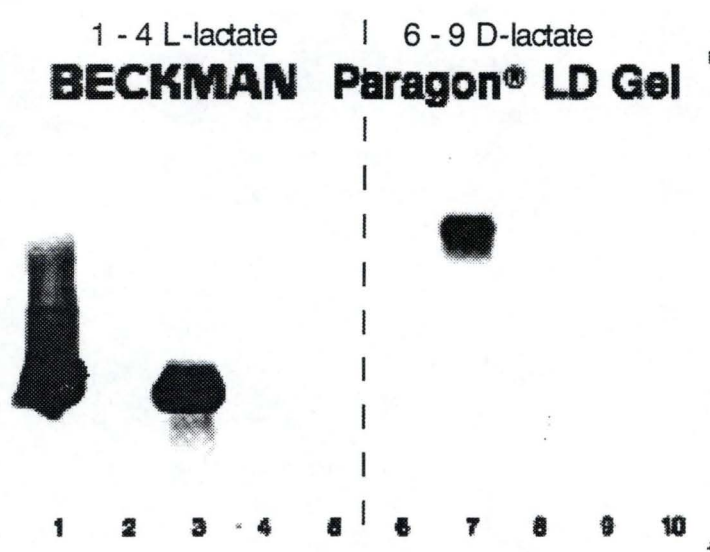


Fig. 23 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes; révélé en présence de L- ou de D-lactate. Pistes 1 & 6 : L-LDH commerciale; 2 & 7 : D-LDH commerciale; 3 & 8 : Echantillon L-LDH purifié; 4 & 9 : Echantillon L-LDH/T246W purifié

Activité d'oxydation de l'enzyme mutant

Des essais de mesure de l'activité oxydante de l'enzyme mutant ont été effectués en présence de 100 et 200 mM de L-lactate et 5 et 2 mM de NAD⁺, à pH 9. Aucune activité n'a pu être détectée dans ces conditions. Notons que les conditions optimales d'activité de l'enzyme sauvage sont de 50 mM en L-lactate, 2 mM en NAD⁺, à pH 9.

De même, un essai de mesure d'activité en présence des mêmes concentrations en D-lactate et NAD⁺, à pH 9, s'est avéré infructueux.

Nous nous sommes ensuite tournés vers d'autres méthodes de détection de l'activité oxydante de l'enzyme: l'utilisation de gels d'électrophorèse en conditions non dénaturantes a permis de tester cette activité pour différents substrats des enzymes sauvages et mutantes.

L'oxydation du **L-lactate** par l'enzyme L-LDH/T246W n'a pas pu être détectée par cette méthode, seuls les enzymes commercial et sauvage ayant une activité détectable. L'enzyme L-LDH/T246W a probablement une activité trop faible pour être décelée par cette technique (figure 23).

Le **D-Lactate** n'a donné lieu à aucune activité d'oxydation détectable, hormis pour l'enzyme D-LDH commercial. Aucune activité n'a été détectée pour l'enzyme L-LDH/T246W (figure 23).

L'enzyme L-LDH commerciale présente une très faible activité en présence de **L-β-phényllactate**, de même que les enzymes commerciaux L-LDH et D-LDH mis en présence d'un mélange de **D- et L-β-phényllactate** (l'isomère D de l'acide β-phényllactique n'est pas commercialisé). Aucune activité n'a été détectée pour l'enzyme L-LDH/T246W.

Discussion et perspectives

Enzyme mutant L-LDH/T246W

La Thr246 est un acide aminé situé dans le site actif et conservé dans toutes les L-LDH connues, il a donc un rôle important pour l'activité de l'enzyme. La mutation T246W introduite dans la protéine L-LDH de muscle de lapin a considérablement modifié les constantes cinétiques de cet enzyme (Tableau 2).

Analysons tout d'abord les constantes cinétiques de L-LDH/T246W obtenues en présence de 0,2 mM de NADH.

Si on compare les valeurs de K_{cat}/K_M , représentant l'efficacité catalytique d'un enzyme, de la protéine native et de la L-LDH/T246W, on remarque que cette dernière est environ 250 fois moins efficace.

Ce rapport est inférieur de 2 ordres de grandeur à ceux obtenus par Sakowicz (21) et Clarke (25) sur la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* lorsqu'ils modifient la Thr246 de cet enzyme.

Clarke (25) attribue la diminution d'efficacité de l'enzyme mutant L-LDH/T246G à l'importante diminution du K_{cat} . D'après l'auteur, cette diminution pourrait être attribuée à l'entrée de molécules d'eau dans le site actif. On imagine aisément l'accroissement de l'espace accessible au solvant généré dans le site actif lorsque la thréonine est remplacée par une glycine.

Sakowicz (21), propose un rôle moins passif de la thréonine 246 dans la réaction catalytique. Il émet l'hypothèse qu'un groupement hydroxyl en position 246 est important pour l'activité catalytique, au détriment de la fixation du substrat. Souvenons nous que dans la malate DH, la Thr246 correspond à la Ser241, ce qui indique qu'à cette position un a.a. possédant un groupement hydroxyl est important pour le maintien d'une activité catalytique optimale. Sakowicz propose donc un rôle de stabilisation de l'état de transition du NADH pour le groupement hydroxyl de la Thr246.

Cette hypothèse fournit une explication plausible de la diminution du K_{cat} et d'un *status quo* du K_M pour notre mutant. Il est probable que la mutation T246W modifie l'étape limitante de la réaction catalytique. Cette étape limitante était, pour l'enzyme sauvage, la fermeture de la boucle peptidique (résidus 98 à 110) sur le site actif, et la mutation introduite ne devrait théoriquement pas modifier cette étape, puisque la Thr246 est située à l'autre extrémité du site actif par rapport à la boucle. Par contre, si la

Thr246 est remplacée par un Trp, la stabilisation de l'état de transition serait affectée, et par conséquent cette étape de la réaction pourrait devenir l'étape limitante.

En ce qui concerne le K_M de notre mutant, il semble ne pas être affecté par la mutation. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que ce résidu n'intervient pas ou peu dans la fixation du pyruvate par l'enzyme. Sakowicz a observé que le remplacement de la Thr246 par une Leu augmente le K_M de l'enzyme de deux ordres de grandeur, le remplacement de ce même résidu par d'autres a.a. de volume semblable ne le modifie que peu ce K_M (environ doublé).

L'analyse des paramètres cinétiques obtenus pour des concentrations variables en pyruvate, en présence de 0,5 mM en NADH, démontre un changement drastique par rapport aux données obtenues en présence de 0,2 mM en NADH. En effet, l'efficacité catalytique est diminuée : elle est 670 fois plus faible que celle obtenue en présence de 0,2 mM en NADH. Cette comparaison d'efficacité catalytiques démontrent qu'une concentration élevée en NADH provoque une inhibition de l'activité enzymatique. La diminution de l'efficacité catalytique constatée à concentration élevée en NADH est provoquée par une augmentation drastique du K_M vis-à-vis du pyruvate. Cependant, le calcul de l'efficacité catalytique ne tient pas compte de la constante d'inhibition par le pyruvate (K_I). A concentration élevée en NADH, l'inhibition de l'activité par le pyruvate est moindre, ce qui permet au mutant L-LDH/T246W de présenter une activité supérieure en présence de 10 mM de pyruvate et 0,5 mM de NADH, par rapport à l'activité mesurée en présence de 10 mM de pyruvate et 0,2 mM de NADH.

L'absence d'activité détectable en présence de L-lactate pourrait s'interpréter dans ce contexte: le groupement hydroxyl de la Thr246 interviendrait essentiellement dans la fixation du substrat réduit et pas ou peu dans celle de la forme oxydée. Dès lors, le remplacement de la Thr246 par un Trp pourrait conduire à une augmentation du K_M de l'enzyme mutante T246W par rapport à l'enzyme sauvage. De plus, il ne peut être exclu que la déstabilisation de l'état de transition par la mutation T246W conduise à une augmentation du K_{cat} de plus de deux ordres de grandeur. La combinaison de ces deux phénomènes conduirait à rendre l'activité enzymatique indétectable avec le L-lactate.

Il convient de signaler que les paramètres cinétiques analysés ici sont issus d'expériences qu'il est impératif de répéter, car les mesures de vitesse initiale ont été effectuées sans réplicat . Les interprétations présentées ci-dessus demandent donc à être confirmées.

L'analyse du modèle de la L-LDH/T246W montre également que le Trp246 ne peut jouer le rôle attribué à la Thr246 de l'enzyme sauvage. Les paramètres cinétiques sont donc en accord avec le modèle de la poche de fixation du substrat pour le mutant L-LDH/T246W.

La comparaison des modèles de la poche de fixation du substrat de la D-LDH et de la L-LDH/Q102R/R171F a révélé que la présence d'un plancher hydrophobe à proximité du méthyl du pyruvate pouvait être cruciale pour l'obtention d'une activité menant à la synthèse de D-lactate. L'analyse du modèle du mutant L-LDH/T246W a montré qu'il est possible que le Trp introduit joue le rôle de plancher hydrophobe. En effet, dans le modèle de la poche de fixation du substrat du mutant L-LDH/T246W, la chaîne latérale du Trp246 se positionne à proximité de l'Arg171. Toutefois, la modélisation du triple mutant L-LDH/Q102R/R171F/T246W n'aboutit pas à un plancher hydrophobe. En effet, lorsqu'on compare les modèles de la L-LDH/T246W et de la L-LDH/Q102R/R171F/T246W, on constate que la chaîne latérale du Trp246 n'adopte plus une conformation favorable à la formation d'un plancher hydrophobe dans le modèle du triple mutant. Le changement de position du Trp nécessite cependant des investigations supplémentaires, afin de déterminer si ce changement est réellement dû à une incompatibilité à former une structure en plancher hydrophobe, ou si des paramètres de modélisation ont provoqué ce changement de conformation.

Conclusion générale

L'analyse des effets de la mutation T246W sur la L-LDH nous a permis de proposer que cette substitution affecte l'état de transition, conformément à ce qui avait été prédit sur base d'un modèle 3D du mutant. L'analyse d'un triple mutant L-LDH/Q102R/R171F/T246W permettrait de déterminer s'il est possible de greffer une activité D-LDH sur une structure initiale de L-LDH. Il est apparu qu'il est probablement préférable de considérer un enzyme non pas dans ses deux états -avant et après catalyse- mais plutôt comme un système continu. Considérer tout le mécanisme catalytique, dont l'état de transition, pourrait augmenter la puissance potentielle de l'ingénierie protéique.

Matériel

Souches bactériennes

Escherichia coli TG1 (Commercialisée par Amersham)

Génotype : *SupE, hsd, thi, D(lac- proAB), F'((traD36 proAB⁺ lac I^q lacZΔM15))*

Caractéristiques principales du phénotype : Le gène *thi* codant pour la vitamine B1 est muté. L'addition de thiamine au milieu minimum est donc indispensable pour ce type de souches.

Le facteur F' permet la formation de pilli sexuels et est donc indispensable à l'infection par le phage M13.

E. coli AR58 (43)

Génotype : *sup⁰, galK2, galE::TN10, tet^r, (lacI857 DH1 bio⁻ uvrB, kil⁻ cIII⁻) Str^r*

Caractéristiques principales du phénotype : Le gène *tet^r* procure à la souche une résistance à la tétracycline. *lacI857* est un répresseur thermosensible (inactivé à 42°C) du phage λ.

Plasmides

pOTSNco12 (dérivé du vecteur pAS (43))

Ce plasmide contient une origine de réplication (*ori*) Col E1 pour *E. coli* et porte le gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*) ainsi qu'un promoteur de phage λ. Ce promoteur est réprimé par la présence du répresseur CI du phage λ. Ce plasmide est de type "medium copy".

pGIPM10 (41)

Le plasmide pGIPM10 a été construit à partir de pOTSNco12. Il contient l'origine de réplication Col E1 et le gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*). Il porte la partie codante de la LDH de muscle de lapin en aval du promoteur du phage λ.

Phages

M13mp18 (Commercialisé par Amersham)

M13 est un phage spécifique mâle. Il infecte via le pilli F, où pilli sexuel, auquel il s'adsorbe avant de pénétrer dans la cellule. Toutes cellules hôtes du phage M13 doivent donc porter le facteur F'.

L'ADN du phage M13mp18 contient 7250 pb. Il contient une origine de réplication (*ori*) bidirectionnelle. Il contient un site de clonage multiple en position 6231-6282.

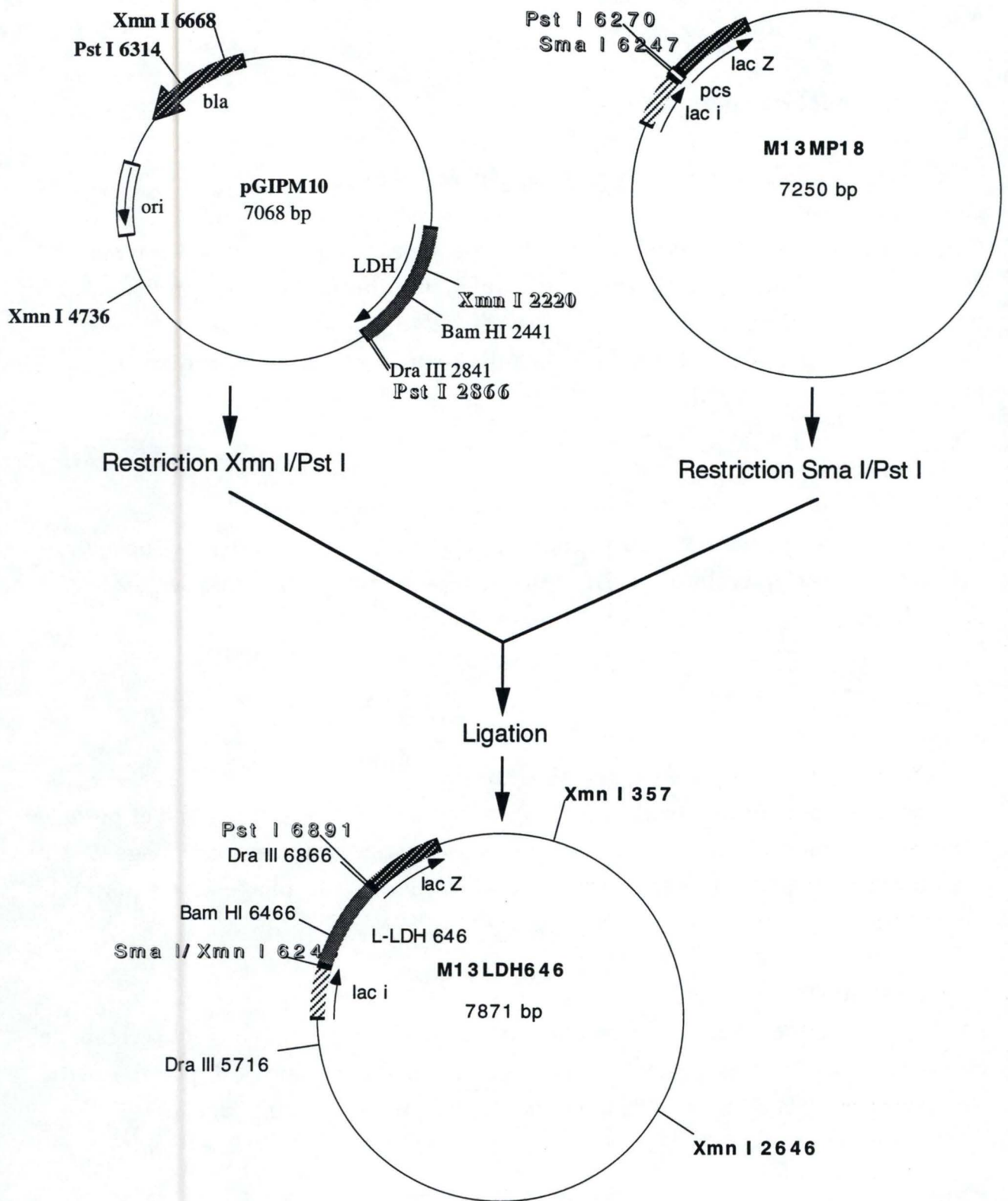


Figure 24: Construction du phage M13LDH646.
Les sites de restriction utilisés sont en ombrés

M13LDH646 (C. Vinals, non publié)

Ce phagemide a été construit à partir de pGIPM10. Ce plasmide contient un fragment *Xmn* I - *Pst* I de 646 paires de bases de la séquence codante de la LDH de muscle de lapin. Le fragment de 646 paires de bases correspond aux résidus Asn 115 à Glu 329. Le site *Xmn* I a été perdu au cours de la construction car il a été ligué à un site *Sma* I, qui est également clivé en bouts francs (Figure 24).

Tampons

P1 + RNase :

Tris/HCl 50 mM

EDTA 10 mM

pH 8,0

- Ajouter 400 µg de RNase par ml et porter à ébullition durant 15'

P2 :

NaOH 200 mM

SDS 1 %

P3 :

KAc 2,6 M

pH 5,2

N2 :

Tris 100 mM

Ethanol 15%

KCl 900 mM

- Amener à pH 6,3 avec H₃PO₄

N3 :

Tris 100 mM

Ethanol 15%

KCl 1,15 M

- Amener à pH 6,3 avec H₃PO₄

N5 :

Tris 100 mM

Ethanol 15 %

KCl 1 M

- Amener à pH 8,5 avec H₃PO₄

TBE 10X :

Tris HCl	108 g
Sel de Borate	55 g
EDTA (pH 8,0)	9,3 g
- Dissoudre dans un litre d'eau distillée	

TAE 50X :

Tris HCl	242 g
Acide acétique	57,1 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0) ...	100 ml
- Dissoudre dans un litre d'eau distillée	

Tampon de marqueur de taille pour gel d'agarose

Tris	10 mM
NaCl	5 mM
EDTA	0,1 mM

Milieux de culture

Milieux solides

Milieu minimum glucose/M9 (thiamine) (MM9) 200ml

M9 10x.....	20 ml
eau distillée	180 ml
Agar.....	3 g
- Autoclaver, et ajouter à lorsque la solution est refroidie à 60°C :	
MgSO ₄ 1M.....	200 ml
Thiamine HCl 1M.....	200 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O 1M.....	20 ml
Glucose 20%	2 ml

LB Agar 400 ml

Tryptone	4 g
Yeast Extract	2 g
NaCl	2 g
Agar	6,4 g

H Plate 200ml

Tryptone	2g
NaCl	1,6 g
Agar	3 g

H TopAgar 40ml

Tryptone	400 mg
NaCl	320 mg
Agar	320 mg

Milieux liquides

LB 400 ml

Tryptone	4 g
Yeast Extract	2 g
NaCl	2 g

SOC 40 ml

Tryptone	800 mg
Yeast Extract	200 mg
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Solutions

M9 10x

Na ₂ HPO ₄	6 %
KH ₂ PO ₄	3 %
NH ₄ Cl	1 %
NaCl	0,5 %

Solutions d'antibiotiques (à utiliser à 1/1000^{ème} de volume) :

- ampicilline 10 % dans de l'eau distillée, stérilisé par filtration (filtre Millipore) 0,22 µm
- tétracycline 12,5 mg/ml dans un mélange 50 % eau distillée 50 % éthanol

Solution de protéinase K (Boehringer Mannheim) :

- Dissoudre 1 mg de protéinase K par ml d'eau pure
- A utiliser à 1/20^{ème} de volume

Solution de RNase (Macherey - Nagel) :

- Incuber 1 mg de RNase par ml d'eau pure 60' à 37°C
- A utiliser à 1/10^{ème} de volume

Solution de coloration et d'alourdisseur pour ADN (6X) :

Bleu de bromophénol	1 mg
Saccharose 80 %	2,7 ml
TAE 10X	0,3 ml
SDS 1 %	1 ml
EDTA 0,5 M	1 ml

Marqueur de taille pour gel d'agarose

λ / Hind III (Gibco BRL)	100 μ l
tampon de marqueur de taille	700 μ l
Bleu de bromophénol 6x	200 μ l

- Incuber 10' à 65°C et aliquoter par 10 μ l
- Conserver à - 20°C

Solution d'IPTG (Isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside) :

100 mM IPTG dans de l'eau pure
Filtrer sur membrane 0,2 μ m

Solution de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside) :

2% X-Gal dans du N,N' diméthylformamide

Solution E (Folin)

CuSO ₄ 5H ₂ O 1 %	1 %
Tartrate de K Na tétracyclinehydraté 2 %	1 %
NaOH 0,2 M	49 %
Na ₂ CO ₃ 4 %	49 %

Solution de révélation pour gels d'électrophorèse Paragon (Beckman)

- Dissoudre dans 2 ml de tampon LD (fourni avec le kit)

NAD	5,6 mM
NBT (nitro blue tétracyclinezolium) ..	2,4 mM
PMS (phénazine méthosulfate)	0,33 mM
substrat (L-/D-lactate, ...)	208 mM

Solution de fixation pour gel de séquençage

Acide acétique	10 %
Méthanol	10 %

Tampon et solutions pour gel d'électrophorèse d'acrylamide

Solution d'acrylamide-bisacrylamide

Acrylamide	30 %
Bisacrylamide	0,8 %

'Running' gel

Solution d'acrylamide-bisacrylamide..	4 ml
Tris 1,5 M SDS 0,4 % pH 8,8	2,5 ml
Eau distillée	3 ml

-Ajouter au moment de couler le gel:

TEMED	10 µl
Persulfate d'ammonium 1 %	500 µl

'Stacking' gel

Solution d'acrylamide-bisacrylamide..	1 ml
Tris 0,5 M SDS 0,4 % pH 6,8	2,5 ml
Eau distillée	5,5 ml

- Ajouter au moment de couler le gel:

TEMED	10 µl
Persulfate d'ammonium 1 %	1 ml

Tampon d'électrophorèse

Tris base	125 mM
Glycine	960 mM
SDS	0,5 %

Tampon d'échantillons 5x

Tris HCl pH 8,3	312,5 mM
SDS	10 %
Bleu de bromophénol	0,005 %
b-mercaptoéthanol	25 %
Glycérol	50 %

Solution de coloration

Bleu R250 (Coomassie)	0,1 %
Acide acétique	10 %
Méthanol	40 %
Eau distillée.....	50 %

Solution de décoloration

Acide acétique	10 %
Méthanol	40 %
Eau distillée	50 %

Tampons et solutions pour chromatographie

Tampon Phosphate

NaH ₂ PO ₄	50 mM
EDTA	0,2 mM
DTT	0,2 mM

- Porter à pH 7.3 avec du NaOH 6N

Tampon Citrate pH4

Citrate	50 mM
EDTA	0,2 mM
DTT	0,2 mM

- Porter à pH 4.0 avec du NaOH 6N

Tampon Citrate/Phosphate

- Placer dans une bouteille 200 ml de tampon phosphate pH 7,3 et ajouter du tampon citrate pH 4 jusqu'à obtention d'un pH 6,5

Tampon Citrate/Phosphate/NaCl/NADH

Tampon Citrate/Phosphate	50 mM pH 6,5
EDTA	0,2 mM
NaCl	1 M
NADH	1mM

Méthodes

Techniques relatives aux cellules

Préparation de cellules compétentes

Préparation de cellules compétentes au CaCl₂

- A partir d'une colonie de la souche *E. coli* (TG1 ou AR58), obtenue sur milieu solide (MM9 pour TG1 ou LB Agar + tétracycline pour AR58), effectuer une préculture O.N. à 37°C dans 5 ml de milieu liquide (LB pour TG1 ou LB + tétracycline pour AR58)

- Transférer la préculture dans un Erlenmeyer de 1 L contenant 400 ml du même milieu
- Incuber à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. à 550 nm de 0,3 et placer 10' sur glace
- Répartir la culture dans 4 bouteilles à centrifugation froides de 250 ml
- Centrifuger 5' à 4000g et à 4°C
- Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 1/2 volume de CaCl₂ 50 mM froid
- Laisser 20' sur glace
- Recentrifuger 5' à 4000g et à 4°C
- Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 1/10 du volume de départ de CaCl₂ 50 mM + glycérol 15 % froid
- Réunir et aliquoter en 1 ml dans des Eppendorf stériles froids
- Stocker à - 80°C

Préparation de cellules électrocompétentes

- A partir d'une colonie de la souche *E. coli* (TG1 ou AR58), obtenue sur milieu solide (MM9 pour TG1 ou LB Agar + tétracycline pour AR58), effectuer une préculture O.N. à 37°C dans 5 ml de milieu liquide (LB pour TG1 ou LB+ tétracycline pour AR58)
- Transférer la préculture dans un erlen de 1 L contenant 400 ml du même milieu
- Incuber à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. à 550 nm de 0,5 et placer 20' sur glace
- Centrifuger 15' à 4000g et à 4°C
- Eliminer le surnageant et ajouter au culot 200 ml d'eau froide et stérile
- Centrifuger 15' à 4000g et à 4°C
- Eliminer le surnageant et ajouter au culot 100 ml d'eau froide et stérile
- Centrifuger 15' à 4000g et à 4°C
- Eliminer le surnageant et ajouter au culot 4 ml de glycérol 10% froid et stérile
- Centrifuger 15' à 4000g et à 4°C
- Eliminer le surnageant et ajouter au culot 600 µl de glycérol 10 % froid et stérile
- Aliquoter par 100 µl et stocker à - 80°C

Transformation par de l'ADN plasmidique

1° Transformation de cellules CaCl₂ - compétentes

- Dégeler les cellules sur glace
- Placer 200 µl de cellules compétentes dans un Eppendorf stérile
- Ajouter la solution contenant le plasmide (maximum 10 µl)
- Laisser 40' dans la glace

- Incuber 2' à 42°C en agitant légèrement dans un bain oscillant
- Ajouter 0,5 ml de milieu LB préchauffé à 37°C
- Incuber 1 heure à 37°C sans agiter
- Etaler par 100 µl sur boîte LB Agar + tétracycline + ampicilline
- Incuber O.N. à 37°C

2° Transformation par électroporation

- Dégeler les cellules électrocompétentes sur glace
- Dans un Eppendorf stérile froid, mélanger 100 µl de cellules avec 10 ng d'ADN (pas plus de 10 µl) et laisser au moins 1' sur glace
- Placer le "Gene Pulser" à 25 µF et 2.5 kV et le "Gene Controller" à 200 Ω
- Transférer le mélange d'ADN et de cellules dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm de largeur
- Placer cette cuvette entre les 2 électrodes de l'électroporateur et mettre sous tension
- Enlever la cuvette et y ajouter immédiatement 1 ml de milieu SOC
- Transférer le mélange dans un Eppendorf et incuber 1 heure à 37°C
- Etaler sur boîte LB Agar

Transformation de cellules compétentes par un phage du type M13

- A partir d'une colonie de la souche TG1 de *E. coli*, obtenue sur milieu solide MM9, effectuer une préculture O.N. à 37°C dans 5 ml de milieu LB liquide
- Diluer cette préculture 50 fois et incuber à 37°C jusqu'à obtention d'une D.O. à 550 nm de 0,5
- Placer 300 µl de cellules compétentes dans un tube en polypropylène stérile maintenu dans la glace
- Ajouter l'ADN (maximum 10 µl)
- Laisser 40' dans la glace
- Placer 45'' dans un bain à 42°C
- Laisser 5' dans la glace
- Préparer dans un Eppendorf 200 µl de cellules en phase exponentielle de croissance (D.O.550 = 0,5) + (si nécessaire) 40 µl d'IPTG 100 mM + 40 µl de X-Gal 2%
- Ajouter ce mélange dans le tube en polypropylène précité
- Ajouter ensuite dans ce même tube 3 ml de H Top Agar préchauffé à 45°C et verser rapidement sur la boîte de H Plate Agar préchauffée à 37°C
- Incuber O.N. à 37°C
- La présence de cellules infectées par des phages se manifeste par l'apparition de plages de moindre croissance (plaques)

Techniques relatives à l'ADN

Purification d'ADN

Préparation d'ADN simple brin de phage M13

- A partir d'une colonie de la souche *E. coli* TG1 portant le phage à préparer, obtenue sur milieu solide MM9, effectuer une préculture O.N. à 37°C dans 5 ml de milieu LB liquide

- 2) - Placer 5 ml de milieu LB dans un Corex stérile de 15 ml et ajouter 100 µl de la préculture
 - Incuber 1h à 37°C sous agitation
 - Infecter avec une plaque de phage à l'aide d'un cure-dent stérile
 - Incuber à 37°C sous agitation lente durant 15' puis sous agitation rapide pendant 4-5 heures
 - Centrifuger 5' à 13000g
 - Prélever le surnageant
 - Placer le surnageant 10' à 60°C
 - Le surnageant se conserve à 4°C

- 3) - A partir d'une colonie de la souche *E. coli* TG1 portant le phage à préparer, obtenue sur milieu solide MM9, effectuer une préculture O.N. à 37°C dans 5 ml de milieu LB liquide
 - Diluer 1 ml de cette culture dans 100 ml de milieu LB
 - Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO à 550 nm de 0.3 (2h-2h30)
 - Ajouter à cette culture 1 ml du surnageant obtenu précédemment (phase 2)
 - Incuber 4-5 h à 37°C sous agitation
 - Transférer dans un tube à centrifugation
 - Centrifuger à 4°C pendant 30' à 5000 g

- 4) - Récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes à centrifugation sans prélever de cellules
 - Ajouter 0,2 volume de PEG 20 %/NaCl 2,5 M
 - Mélanger et laisser 30' sur glace
 - Centrifuger 20' à 4°C à 10000g et éliminer le surnageant
 - Recentrifuger 5' et éliminer complètement le surnageant
 - Resuspendre le culot avec 1 ml d'eau pure et transférer dans un Corex
 - Centrifuger 5' à 5000g
 - Transférer délicatement le surnageant dans un nouveau Corex

- Ajouter 1 ml de PEG 20 %/NaCl 2,5 M
- Mélanger et laisser 15' à température ambiante ou O.N. à 4°C
- Recentrifuger 5' et éliminer le surnageant
- Recentrifuger et éliminer toutes traces de PEG à la pipette
- Resuspendre dans 500 ml d'eau pure
- Ajouter de la protéinase K (concentration finale : 50 µg/ml) et de la RNase (concentration finale : 0,1 mg/ml)
- Incuber 1 heure à 37°C
- Extraire les protéines au phénol et précipiter l'ADN
- Conserver à -20°C

Préparation d'ADN double brin de phage M13 (petites quantités)

- A partir d'une colonie de la souche *E. coli* TG1 portant le phage à préparer, obtenue sur milieu solide MM9, effectuer une préculture O.N. à 37°C dans 5 ml de milieu LB liquide
- 2) - Diluer 50 µl de cette culture dans 5 ml de milieu LB
- Incuber 1 heure à 37°C
 - Infecter par une plaque de phage à l'aide d'un cure-dent stérile
 - Incuber 4-5 heures à 37°C
- 3) - Placer 1,5 ml de cette culture dans un Eppendorf
- Centrifuger 5' à 13000g
 - Éliminer le surnageant
 - Si le culot est trop petit, rajouter 1,5 ml de culture et recentrifuger
 - Resuspendre le culot avec 0,3 ml de tampon P1 + Rnase
 - Ajouter 0,3 ml de tampon P2
 - Mélanger légèrement par retournement et incuber 5' à température ambiante
 - Ajouter 0,3 ml de tampon P3
 - Mélanger légèrement
 - Centrifuger 20' à 4°C à 13000g
 - Prélever le surnageant
 - Centrifuger 15' à 13000g
 - Prélever le surnageant
 - Ajouter 0,72 ml d'isopropanol et agiter vigoureusement
 - Centrifuger 15' à 13000g
 - Éliminer le surnageant
 - Ajouter 1 ml d'éthanol 70 %
 - Centrifuger 10' à 13000g
 - Éliminer le surnageant
 - Laisser sécher le culot

- Resuspendre le culot dans 18 ml d'H₂O pure + 2 ml de tampon P1 + RNase
- Conserver à - 20°C

Préparation d'ADN double brin de phage M13 (grandes quantités)

Réaliser les étapes 1,2 & 3 de la purification d'ADN simple brin de phage M13

- 4) - Eliminer le surnageant et resuspendre le culot de cellules avec 4 ml de tampon P1 + RNase
 - Transférer dans un Corex stérile de 30 ml
 - Ajouter 4 ml de tampon P2 et mélanger par retournement
 - Laisser 5' à température ambiante
 - Ajouter 4 ml de tampon P3 et mélanger par retournement
 - Centrifuger 2x15' à 15000g et reprendre le surnageant chaque fois
 - Transférer délicatement le surnageant dans un autre tube de 15 ml
 - Recommencer éventuellement la centrifugation si le surnageant est trouble
 - Equilibrer une colonne Nucleobond AX100 (Macherey-Nagel) avec 2 ml de tampon N2
 - Déposer le surnageant dans la colonne
 - Laver la colonne avec 2x4 ml de tampon N3
 - Eluer l'ADN plasmidique dans un Corex avec 2 ml de tampon N5
 - Précipiter l'ADN avec 1,4 ml d'isopropanol équilibré à température ambiante
 - Laisser 10' sur table
 - Centrifuger 30' à 10000g
 - Eliminer le surnageant et laver le culot avec 2 ml d'éthanol à 70%
 - Centrifuger 15' à 15000g
 - Eliminer le surnageant et sécher le culot
 - Resuspendre dans 150 µl d'eau pure
 - Conserver à -20°C

Préparation d'ADN plasmidique (petites quantités)

- 1) - A partir d'une colonie de la souche *E. coli* AR58 portant le plasmide à préparer, obtenue sur milieu solide LB + ampicilline + tétracycline, effectuer une préculture O.N. à 32°C dans 5 ml de milieu LB liquide + ampicilline + tétracycline.
- 2) Réaliser l'étape 3 de la préparation d'ADN double brin de phage M13 (petites quantités)

Préparation de plasmide (grandes quantités)

1) - A partir d'une colonie de la souche *E. coli* AR58 portant le plasmide à préparer, obtenue sur milieu solide LB + ampicilline + tétracycline, effectuer une préculture O.N. à 32°C dans 5 ml de milieu LB liquide + ampicilline + tétracycline.

- Diluer cette préculture dans 400 ml du même milieu et incubé 20 heures
- Transférer dans un tube à centrifugation
- Centrifuger à 4°C pendant 10' à 5000 g

2) - Réaliser l'étape 4 de la préparation d'ADN double brin de phage M13 (grandes quantités) en remplaçant la colonne Nucleobond AX100 par une colonne Nucleobond AX500 de la même firme, en modifiant les quantités comme suit :

P1 + RNase, P2 & P3 :	10 ml chacun
N2 :	5 ml
N3 :	2x12 ml
N5 :	6 ml
isopropanol :	4,2 ml
éthanol à 70% :	5 ml
eau pure :	400 µl

Extraction de protéines au phénol

- Porter le volume de la solution à extraire à 100 µl (au minimum)
- Ajouter un volume de phénol saturé en Tris 10 mM EDTA 1 mM, pH 8,0
- Vortex 20 à 30"
- Centrifuger 1' à 13000 g
- Transférer la phase aqueuse dans un Eppendorf stérile
- Ajouter un volume de phénol saturé en Tris 10 mM EDTA 1 mM, pH 8,0
- Vortex 20 à 30"
- Centrifuger 1' à 13000 g
- Transférer la phase aqueuse dans un Eppendorf stérile
- Si la solution contient beaucoup de protéines, ajouter à nouveau un volume de phénol saturé en Tris 10 mM EDTA 1 mM, pH 8,0
- Vortex 20 à 30"
- Centrifuger 1' à 13000 g
- Transférer la phase aqueuse dans un nouvel Eppendorf stérile

Précipitation d'ADN

- Ajouter 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2
- Ajouter 2,5 volumes d'éthanol absolu

- Mélanger
- Incuber 30' à -20°C
- Centrifuger 20' à 4°C et 13000 g
- Eliminer le surnageant et ajouter 3,5 volumes d'éthanol 70%
- Centrifuger 5' à 13000g
- Eliminer le surnageant
- Sécher le culot
- Resuspendre dans de l'eau pure

Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Préparation de l'échantillon

- Ajouter 2 ml de solution de coloration et d'alourdisseur à 10 µl de solution d'ADN

Préparation du gel

- Dissoudre et porter à ébullition le TAE 1x + agarose (de 0,8 à 2% selon la séparation désirée)
- Placer les peignes dans la cuve
- Couler l'agarose dans la cuve
- Ajouter 5 ml de bromure d'éthidium 2 % par 50 ml de gel
- Laisser refroidir 30'
- Retirer les peignes
- Placer le gel dans la cuve et le recouvrir de TAE 1x

Migration

- Déposer les échantillons préparés dans les puits
- Migrer à 50 - 100 volts
- Visualiser les bandes d'ADN sur table UV

Restriction d'ADN

- Placer dans un Eppendorf :
 - . ADN à restreindre
 - . 1/10ème du volume final de tampon de restriction 10x livré avec l'enzyme de restriction
 - . Le nombre d'unités d'enzyme nécessaire (1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ en 1 heure) en tenant compte de la taille, de la quantité et du nombre de coupures relatives du phage λ et du plasmide ou du phage à restreindre
- Amener au volume final avec de l'eau pure
- Incuber 1 heure à 37°C

Ligation de fragments d'ADN

- Mélanger dans un Eppendorf :
 - . L'ADN restreint et purifié (200 à 300 ng au total)
 - . 1/5 ème du volume final de tampon ligase 5x fourni avec l'enzyme
 - . Une unité de T4 DNA ligase
- Amener au volume final avec de l'eau pure
- Incuber O.N. à 14°C

Mutagenèse dirigée (Sculptor IVM system; Amersham)

Les tampons sont fournis dans le kit

Phosphorylation de l'oligonucléotide

- Dans un Eppendorf, mélanger :
 - . 500 ng d'oligonucléotide
 - . 2 µl de tampon d'incubation 10x
 - . 2 unités de T4 polynucléotide kinase
 - . porter à 20 µl avec de l'eau pure
- Incuber 15' à 37°C
- Inactiver 10' à 70°C
- Stocker à - 20°C

Hybridation de l'oligonucléotide phosphorylé

- Dans un Eppendorf, ajouter :
 - . 2 µl d'ADN simple brin (1 µg)
 - . 1 µl d'oligonucléotide phosphorylé (25 ng)
 - . 1 µl de tampon A
 - . 5 µl d'eau pure
- Incuber 3' à 70°C, puis 30' à 37°C
- Conserver sur glace

Extension et ligation du brin d'ADN mutant

- A l'Eppendorf d'hybridation, ajouter :
 - . 10 µl de dNTP mix A
 - . 2,5 unités de T4 DNA ligase
 - . 0,8 unités de T7 DNA polymérase
- Incuber 10' à température ambiante, puis 30' à 37°C
- Incuber 15' à 70°C (inactivation des enzymes)
- Conserver 1 µl à -20°C pour analyse sur gel d'agarose

Elimination du simple brin d'ADN non-muté

- A l'Eppendorf d'extension-ligation, ajouter :
 - . 50 µl de tampon B
 - . 2000 unités de T5 exonucléase
- Incuber 30' à 37°C
- Inactiver 15' à 70°C
- Conserver 5 µl à -20°C pour analyse sur gel d'agarose

Restriction du brin d'ADN non-muté

- A l'Eppendorf précédent, ajouter :
 - . 5 µl de tampon C
 - . 5 unités de *Nci* I
- Incuber 90' à 37°C
- Conserver 10 µl à -20°C pour analyse sur gel d'agarose

Digestion du brin d'ADN non-muté

- A l'Eppendorf précédent, ajouter :
 - . 20 µl de tampon D
 - . 160 unités d'exonucléase III
- Incuber 30' à 37°C
- Inactiver 15' à 37°C
- Conserver 10 ml à -20°C pour analyse sur gel d'agarose

Repolymerisation du brin d'ADN clivé

- A l'Eppendorf précédent, ajouter :
 - . 20 µl de dNTP mix B
 - . 3,5 unités d'ADN polymérase I
 - . 2,5 unités d'ADN ligase
- Incuber 1 heure à 37°C
- Conserver 15 µl à -20°C pour analyse sur gel d'agarose
- Conserver à -20°C l'échantillon repolymérisé

Séquençage (¹⁷Sequencing Kit; Pharmacia)

Séquençage sur ADN double brin

- Ajuster la concentration de l'ADN à séquencer à 200 ng/µl
- Mélanger 8 µl d'ADN à séquencer et 2 µl de NaOH 2 M
- Incuber 10' à température ambiante
- Ajouter 3 µl d'acétate de sodium 3 M pH 4,8, 7 µl d'eau distillée et 60 µl d'éthanol
- Placer 15' à -20°C
- Centrifuger 10' à 13000g

- Eliminer le surnageant
- Ajouter 120 μl d'éthanol 70%
- Centrifuger 10' à 13000g
- Eliminer le surnageant
- Préparer dans un Eppendorf 15 μl d'eau pure, 3 μl de tampon d'annealing, 30 ng d'oligonucléotide et resuspendre le culot séché dans 14 μl de cette préparation
- Incuber 5' à 65°C, puis 10' à 37°C et 10' à température ambiante
- Le mélange ADN/oligonucléotide ainsi obtenu est ensuite traité comme décrit ci-dessous pour le séquençage de l'ADN simple brin

Séquençage sur ADN simple brin

- Dans un Eppendorf, mélanger :
 - . 2 μg d'ADN à séquencer
 - . 20 ng d'oligonucléotide
 - . 2 μl de tampon d'Annealing
- Porter à 14 μl
- Vortexer
- Centrifuger rapidement
- Incuber 10' à 60°C suivi de 10' à température ambiante
- Centrifuger rapidement
- Préparer par échantillon à séquencer et dans 4 Eppendorf différents :
 - . 2,5 μl 'A' mix-short (Eppendorf A);
 - . 2,5 μl 'C' mix-short (Eppendorf C);
 - . 2,5 μl 'G' mix-short (Eppendorf G);
 - . 2,5 μl 'T' mix-short (Eppendorf T)
- Ajouter au mélange d'ADN-oligonucléotide :
 - . 3 μl de labelling mix-dATP
 - . 3 unités de T7 DNA polymérase dilués dans 2 μl de tampon de dilution
 - . 1 μl de ($\alpha^{35}\text{S}$) dATP
- Centrifuger rapidement
- Incuber 5' à température ambiante
- Déposer 4,5 μl du mélange marqué dans chacun des Eppendorf A, C, G et T, préchauffés à 37°C
- centrifuger rapidement
- Incuber 5' à 37°C
- Ajouter 5 μl de solution stop dans chaque Eppendorf A, C, G et T
- Centrifuger rapidement
- Conserver à -20°C

Préparation du gel de séquençage

- Laver les faces internes des plaques de verre avec de l'alcool
- Etendre une fine couche de *Repelcote* sur la face interne d'une seule plaque de verre
- Laisser sécher 30'
- Préparer :
 - . 10 ml TBE 10x
 - . 15 ml Acrylamide 20% (5,7 g) Bisacrylamide 0,8% (300 mg)
 - . 42 gr d'urée
 - . Porter à 100 ml avec de l'eau distillée
- Dissoudre sous agitation
- Filtrer sur membrane 0,45 μm
- Positionner les "spacers" sur la plaque la plus grande
- Superposer les 2 plaques
- Dégraisser les côtés des plaques avec un détergent
- Immobiliser les plaques à l'aide de papier collant
- Au moment de couler le gel, ajouter 600 μl de persulfate d'ammonium 10% et 30 μl de TEMED
- Relever légèrement les verres et couler le gel à l'aide d'une seringue de 50 ml, en évitant les bulles d'air
- Placer les peignes à l'envers (face plate tournée vers le gel) entre les deux verres, au sommet du gel
- Laisser polymériser horizontalement pendant 20'
- Le gel ainsi obtenu peut être conservé O.N. à 4°C

Migration et révélation

- Préchauffer le gel 30' avant le dépôt des échantillons
- Retirer les peignes et évacuer l'urée des puits
- Positionner les peignes et éliminer toute trace d'urée
- Déposer les échantillons (2 à 4 μl)
- Migrer 2 heures à 1,6 kV et 60 W
- Une fois la migration terminée, séparer les deux plaques de migration
- Immerger la plaque avec le gel 20' dans une solution de fixation
- Poser une feuille de papier Watman 17 Chr sur le gel
- Retirer la feuille avec le gel
- Couvrir la feuille avec le gel de plastique alimentaire
- Sécher 90' à 80°C sous vide
- Retirer le film plastique
- Impressionner un film autoradiographique O.N.

- Immerger le film 3' dans une solution de révélation, puis 10' dans une solution de fixation
- Sécher le film

Techniques relatives aux protéines

Production de LDH

- 1) - A partir d'une colonie de la souche *E. coli* AR58 portant le plasmide de production, obtenue sur milieu solide LB + ampicilline + tétracycline, effectuer une préculture O.N. à 32°C dans 5 ml de milieu LB liquide + ampicilline + tétracycline.
 - Diluer cette préculture dans 1 l de LB + ampicilline + tétracycline et incubé 4 heures à 32°C sous agitation
 - Transférer rapidement à 42°C et incubé 4 heures sous agitation
 - Répartir la culture dans 4 tubes à centrifugation
 - Centrifuger 20' à 5000g à 4°C
 - Eliminer le surnageant et laver le culot avec du tampon phosphate pH 7,3
 - Centrifuger 5' à 5000g à 4°C
 - Eliminer le surnageant; le culot se conserve éventuellement O.N. à 4°C
 - Resuspendre chaque culot dans 2,5 ml de tampon phosphate pH 7,3
 - Transférer dans un Corex de 30 ml et soniquer 5 fois 15" à 45" d'intervalle sur glace
 - Centrifuger 30' à 13000g à 4°C
 - Récupérer le surnageant (fraction soluble, supposée contenir la LDH). Un aliquot peut être prélevé à cette étape. Le surnageant peut éventuellement être stocké O.N. à 4°C
 - Eventuellement resuspendre le culot (fraction insoluble) dans du tampon phosphate 7,3 et en conserver un aliquot

Précipitation au sulfate d'ammonium

Détermination de la concentration en sulfate d'ammonium adéquate pour la précipitation de la LDH

- Aliquoter la fraction soluble en 12 x 1,5 ml
- Précipiter chaque aliquot avec des concentrations en sulfate d'ammonium allant de 1,5 M à 2,5 M
- Centrifuger les aliquots 15' à 13000 g à 4°C
- Eliminer les surnageants et resuspendre chaque culot dans 1 ml de tampon phosphate

- Doser l'activité et la concentration en protéines sur chaque aliquot

Précipitation de la LDH en routine

- ajouter du sulfate d'ammonium à la fraction de protéines solubles, jusqu'à une concentration finale de 2,4 M
- centrifuger 15' à 13000g, à 4°C

Mesure d'activité de l'enzyme L-LDH

- Mélanger dans une cuvette de 1 ml :
 - . 700 µl de tampon phosphate 50 mM (pH variable)
 - . 100 µl de substrat (concentration variable)
 - . 100 µl de solution d'enzyme (concentration variable)
 - . 100 µl de NADH ou de NAD⁺ (concentration variable)
- Lire l'absorbance à 340 nm pendant 2'

Dosage de la concentration en protéines : Méthode de Folin

- A 250 µl d'échantillon ajouter 1,25 ml de solution E
- mélanger au vortex et laisser 10' température ambiante
- Ajouter 152 µl de réactif de Folin (Ciocalteu du phénol) dilué 2x
- Mélanger au vortex et laisser 30' à température ambiante
- Lire l'absorbance à 750 nm

L'étalonnage est réalisé avec des solutions de BSA de concentrations connues

Electrophorèse de protéines en conditions non dénaturantes (coffret Paragon Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Electrophoresis; BECKMAN)

Préparation des échantillons

- Porter les solutions à séparer à 1,2 unités d'enzyme par ml
- La L-LDH commerciale est utilisée à 1 et 10 µg par ml
- La D-LDH commerciale est utilisée à 2 unités par ml

Procédure d'électrophorèse

- Remplir chaque compartiment de la cuve d'électrophorèse Paragon avec 45 ml de tampon LD
- Placer le gel sur une feuille de papier
- Sécher le gel délicatement avec un buvard
- Mettre en place la matrice d'application :
- Déposer 3 à 5 µl d'échantillon sur chaque fente de la matrice et laisser diffuser 5' à compter du dernier dépôt d'échantillon

- Sécher délicatement la matrice avec un buvard
- Pacer le gel dans la cuve d'électrophorèse et fermer la cuve
- Migrer 20' à 100 Volts

Révélation

- Retirer le gel de la cuve et le placer sur un buvard pour gel
- Saturer un buvard pour gel avec une solution de substrat LD et le poser délicatement sur le gel
- Incuber 30' à 37°C
- Retirer les buvards du gel et plonger celui-ci dans une solution d'acide acétique à 5% pendant 1'
- Mettre une feuille de papier sur la table et y déposer le gel
- Imprégner un buvard pour gel de solution d'acide acétique à 5% et le déposer sur le gel
- Couvrir de 2 buvards pour séchage
- Positionner la presse sur le gel et les buvards pendant 3'
- Enlever le gel de la presse et retirer les buvards
- Plonger le gel dans une solution d'acide acétique à 5% pendant 1'
- Enlever l'excès d'acide acétique sous le gel et le sécher complètement

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Préparation du gel

- Couler le "running" gel et ajouter une couche d'alcool isoamylique
- Laisser polymériser 30'
- Eliminer l'alcool isoamylique avec un papier absorbant
- Couler le "stacking" gel jusqu'au bord des plaques avec les peignes
- Laisser polymériser 30'

Préparation des échantillons

- Dans un Eppendorf, mélanger :
 - . 4 µl de tampon d'échantillons
 - . entre 0,1 et 30 µg de protéines selon le nombre de bandes à visualiser
 - . eau distillée (porter à 20 µl au maximum)
- Placer les échantillons dans un bain à 100°C pendant 3'

Dépôt et migration

- Déposer les échantillons préparés dans les puits
- Migrer 90' à 120 Volts dans du tampon d'électrophorèse

Coloration au bleu de Coomassie

- Enlever le gel de la cuve
- Plonger le gel dans la solution de coloration au bleu de Coomassie durant 15-30'
- Décolorer le gel dans la solution de décoloration durant environ 1 heure sous agitation lente en renouvelant la solution toutes les 15'
- Incuber 10' dans la solution de fixation
- Sécher le gel sous vide entre 2 feuilles de cellophane humides

Purification de L-LDH de muscle de lapin

Chromatographie d'affinité : Colonne HiTrap Blue 5 ml (Pharmacia)

- Resuspendre le culot de lysat précipité dans 1 ml de tampon citrate/phosphate 50 mM pH 6,5
- Injecter dans la colonne préalablement équilibrée avec du tampon citrate/phosphate 50 mM pH 6,5
- Laver la colonne avec le même tampon à 2 ml/min
- Eluer à 1 ml/min avec un gradient de tampon citrate/phosphate/NaCl/NADH en 30'
- Récupérer et rassembler les fractions d'intérêt, en conserver un aliquot
- Précipiter à saturation en sulfate d'ammonium (432 gr/l)
- Conserver éventuellement à 4°C

Chromatographie sur tamis moléculaire : Colonne Superose 12HR (Pharmacia)

- Centrifuger le précipitat issu de la chromatographie précédente 15' à 13000g
- Resuspendre le culot dans 200 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7,3
- Injecter dans la colonne préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 50 mM pH 7,3
- Eluer à 0,5 ml/min et recueillir le pic à 22', en conserver un aliquot
- Conserver à 4°C

Fluorescence

(Unité Hormone et métabolisme de Mr G. G. Rousseau; ICP-UCL)

- Porter la solution de protéine pure à analyser à 10 ng/ml
- Régler le fluorimètre sur une longueur d'onde d'excitation de 278 nm
- Régler le scanning d'émission de 300 à 400 nm
- Régler les fenêtres d'excitation et d'émission (excitation and emission slit) à 0,5
- Placer 1 ml de la solution d'enzyme dans la cuvette en quartz à 4 faces polies
- Placer la cuvette dans le fluorimètre, la petite fenêtre vers la source d'excitation
- Enregistrer l'émission entre 300 et 400 nm à raison de 60 nm/minute

Bibliographie

1. Langone JJ. Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications. Methods in ENZYMOLOGY 1991;202.
2. Lehninger AL. Biochimie, bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. Flammarion médecine - sciences 1985;.
3. Holbrook JJ, Liljas A, Steindel SJ, Rossmann MG. Lactate dehydrogenase. The enzymes. (Boyer P.D. Ed.) Academic Press New York 1975;XI:191.
4. Schellenberg KA. The mechanism of hybride transfert. Pyridine nucleotide dependent dehydrogenase 1977;Sund H:15-26.
5. Papadopoulos A, Michaelidis B, Lazou A. Tissue Specific Isoenzymes of D-Lactate Dehydrogenase from the Foot, Mantle and Hepatopancreas of *Patella-Caerulea* (L) - Purification and Properties. Int. J. Biochem. 1990;22(6):601-605.
6. Kochhar S, Hottinger H, Chuard N, et al. Cloning and overexpression of *Lactobacillus helveticus* D-lactate dehydrogenase gene in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 1992;208:799-805.
7. Taguchi H, Ohta T. D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family - Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum*. Journal of Biological Chemistry 1991;266(19):12588-12594.
8. LéJohn HB. D(-)-lactate dehydrogenases in Fungi. Kinetics and allosteric inhibition by guanosine triphosphate. J. Biol. Chem. 1971;246(7):2116-2126.
9. Piontek K, Chakrabarti P, Schar HP, Rossmann MG, Zuber H. Structure Determination and Refinement of *Bacillus-Stearothermophilus* Lactate Dehydrogenase. Prot. Struct. Functi. Gen. 1990;7(1):74-92.
10. Sass C, Briand M, Benslimane S, Renaud M, Briand Y. Characterization of rabbit lactate dehydrogenase-M and lactate dehydrogenase-H cDNAs. J. Biol. Chem. 1989;264(7):4076-4081.
11. Li SSL. Lactate dehydrogenase isozymes A (muscle), B (heart) and C (testis) of mammals and the genes coding for these enzymes. Biochem. Soc. Trans. 1989;17:304-307.

12. Clarke AR, Waldman ADB, Hart KW, Holbrook JJ. The rates of defined changes in protein structure during the catalytic cycle of lactate dehydrogenase. *Biochim. Biophys Acta* 1985;829:397-407.
13. Clarke AR, Wigley DB, Barstow DA, Chia WN, Atkinson T, Holbrook JJ. A single amino acid substitution deregulates a bacterial lactate dehydrogenase and stabilizes its tetrameric structure. *Biochim. Biophys Acta* 1987;913:72-80.
14. Pfleiderer G, Nagel G, Bühler H. Limited proteolysis of lactate dehydrogenase from porcine heart with trypsin : Characterization and reactivation of the fragments. *Experientia* 1991;47:470-475.
15. Grau UM, Trommer WE, Rossmann MG. Structure of the active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase with S-lac-NAD at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1981;151:289-307.
16. Waldman ADB, Hart KW, Clarke AR, et al. The use of a genetically engineered tryptophan to identify the movement of a domain of *B. stearothermophilus* lactate dehydrogenase with the process which limits the steady-state turnover of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1988;150:752-759.
17. Clarke AR, Atkinson T, Holbrook JJ. From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part 1. *TIBS* 1989;14:101-105.
18. Nicholls DJ, Davey M, Jones SE, et al. Substitution of the amino acid at position 102 with polar and aromatic residues influences substrate specificity of lactate dehydrogenase. *Journal of protein chemistry* 1994;13(1):129-133.
19. Clarke AR, Wigley DB, Chia WN, Barstow D, Atkinson T, Holbrook JJ. Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis. *Nature* 1986;324(18):699-702.
20. Bur D, Clarke T, Friesen JD, et al. On the effect on specificity of Thr246-Gly mutation in L-lactate dehydrogenase of *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1989;161(1):59-63.
21. Sakowicz R, Kallwass HKW, Parris W, Kay CM, Jones JB, Gold M. Threonine-246 at the Active Site of the L-Lactate Dehydrogenase of *Bacillus-stearothermophilus* Is Important for Catalysis But Not for Substrate Binding. *Biochemistry* 1993;32(47):12730-12735.

22. Birktoft JJ, Banaszak LJ. The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. X-ray refinement of cytoplasmic malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 1983;258(1):472-482.
23. Wigley DB, Gamblin SJ, Turkenburg JP, et al. Structure of a Ternary Complex of an Allosteric Lactate Dehydrogenase from *Bacillus-Stearothermophilus* at 2.5 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 1992;223(1):317-335.
24. Luyten MA, Bur D, Wynn H, et al. An evaluation of the substrate specificity, and its modification by site-directed mutagenesis, of the cloned L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Am. Chem. Soc.* 1989;111:6800-6804.
25. Clarke AT, Atkinson T, Holbrook JJ. From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II. *TIBS* 1989;14:145-148.
26. Futai M. Membrane D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *Biochemistry* 1973;12:2468-2474.
27. Lamzin VS, Dauter Z, Popov VO, Harutyunyan EH, Wilson KS. High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology* 1994;236(3):759-785.
28. Vinals C, Depiereux E, Feytmans E. Prediction of Structurally Conserved Regions of D-Specific Hydroxy Acid Dehydrogenases by Multiple Alignment with Formate Dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;192(1):182-188.
29. Vinals C. Knowledge-based modeling of D-lactate dehydrogenase three-dimensional structure. *Proteins - Structure Function and Genetics* 1995; to be published.
30. Kochhar S, Hunziker PE, Leongmorgenthaler P, Hottinger H. Primary structure, physicochemical properties, and chemical modification of NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase - Evidence for the presence of Arg-235, His-303, Tyr-101, and Trp-19 at or near the active site. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267(12):8499-8513.
31. Taguchi H, Ohta T. Histidine-296 is essential for the catalysis in *Lactobacillus plantarum* D-lactate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 1993;268(24):18030-18034.

32. Abad-Zapatero C, Griffith JP, Sussman JL, Rossmann MG. Refined crystal structure of dogfish M4 apo-lactate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 1987;198:445-467.
33. Hiraoka BY, Sharief FS, Yang YW, Li WH, Li SSL. The cDNA and Protein Sequences of Mouse Lactate Dehydrogenase-B - Molecular Evolution of Vertebrate Lactate Dehydrogenase Gene-A (Muscle), Gene-B (Heart) and Gene-C (Testis). *Eur. J. Biochem.* 1990;189(2):215-220.
34. Kochhar S, Hunziker PE, Leongmorgenthaler P, Hottinger H. Evolutionary relationship of NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase - Comparison of primary structure of 2-hydroxy acid dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1992;184(1):60-66.
35. Wierenga RK, Terpstra P, Hol WGJ. *J. Mol. Biol.* 1986;187:101-107.
36. Hart KW, Clarke AR, Wigley DB, et al. The importance of arginine 171 in substrate binding by *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1987;146:346-353.
37. Tuengler P, Stein TN, Long GL. Studies on the active center of D- and L-lactate dehydrogenases using oxamate-diaminohexyl-Sepharose affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980;77(10):5832-5836.
38. Goldberg JD, Yoshida T, Brick P. Crystal structure of a NAD-dependent D-glycerate dehydrogenase at 2.4 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* 1994;236(4):1123-1140.
39. Kallwass HKW, Hogan JK, Macfarlane ELA, et al. On the factors controlling the structural specificity and stereospecificity of the L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* - Effects of Gln102->Arg and Arg171->Trp/Tyr double mutations. *Journal of the American Chemical Society* 1992;114(27):10704-10710.
40. Teeter MM. Water-protein interactions - Theory and experiment. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1991;20:577-600.
41. Mertens P, Prozzi D, Delcour J, Vandenhoute J. Overexpression of rabbit muscle L-lactate dehydrogenase in *E. coli*. *Arch. Int. Physiol. Bioch. Biophys* 1991;99:B69.
42. Ainslie GRJ, Cleland W. W. The effect of oligomeric environment on the kinetics of lactate dehydrogenase subunits. *Archives of biochemistry and biophysics* 1982;216(1, June):101-104.

43. Shatzman, Rosenberg. Expression, identification and characterisation of recombinant gene products in *E. coli*. *Methods in enzymology* 1987;152:661-673.

Annexes

Abréviations

a.a. : acide aminé

Ac : acétate

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

BSA : albumine sérique bovine

D : Dalton

DH : déshydrogénase

dNTP : désoxyribonucléotides

DTT : dithiothréitol

EDTA : éthylènedinitrilotétraacétate

FBP : fructose-1,6-biphosphate

FDH : formate déshydrogénase

IPTG : isopropyl β -D thiogalactopyranoside

K_{cat} : constante de vitesse catalytique (turnover number)

K_I : constante d'inhibition

K_M : constante d'affinité de Michaelis-Menten

LDH : lactate déshydrogénase

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NMN : nicotinamide mononucléotide

O.N. : overnight (pendant une nuit)

PEG : polyéthylène glycol

SDS : sodium dodécyl sulfate

TAE : Tris-Acétate-EDTA

TBE : Tris-Borate-EDTA

TEMED : N,N,N',N' tétraméthyléthylènediamine

T_m : température de fusion (melting temperature)

Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

UV : ultraviolets

V_{max} : vitesse maximale

X-Gal : 5-bromo 4-chloro 3-indolyl β -D galactopyranoside

Abréviations des noms des acides aminés

<u>Nom complet</u>	<u>Code 3 lettres</u>	<u>Code 1 lettre</u>
Alanine	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Aspartate	Asp	D
Glutamate	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y