Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Réalisation de la substitution Q102R dans la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin: étude de la relation structure-fonction de l'enzyme

van der Kaa, Vincent

Award date:
1992

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.

Download date: 02. May. 2026

011292

Réalisation de la substitution Q102R dans la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin : étude de la relation structure-fonction de l'enzyme.

Vincent van der Kaa

1992 - 1993

Je voudrais remercier le Professeur E. Feytmans de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir suivi tout au long de cette année.

Je remercie tout particulièrement Carla pour ses connaissances précieuses, pour sa disponibilité et pour sa patience.

Un grand merci à Xavier pour son enthousiasme et sa compétence.

Je remercie également le département de Génétique Moléculaire du Professeur J. Delcour et du Professeur J. Vandenhaute pour son aide précieuse, en particulier : Laurence, Pascal et Jean-Pol.

Mes remerciements vont aussi à Etienne pour ses nombreux conseils et son aide précieuse.

Je tiens aussi à remercier Eric Depiereux, Luc Bertrand, Jean-François, Luc et Laurent pour l'ambiance chaleureuse qu'ils ont su créer au sein du laboratoire.

Toute ma reconnaissance à Mademoiselle Vinals et à Messieurs Coche, Delcour et Magonet qui ont accepté de lire ce mémoire.

Enfin, merci à tous mes proches, et surtout mes parents qui m'ont permis de réaliser ces études et qui les ont vécues avec moi.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Réalisation de la substitution Q102R dans la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin : étude de la relation structure-fonction de l'enzyme.

VAN DER KAA Vincent

Résumé

Le travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des bases moléculaires de la stéréospécificité de la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin. Cette enzyme tétramérique catalyse la réaction de transformation du pyruvate en L-lactate, avec régénération de NAD^+. La glutamine 102 pourrait, selon le modèle tridimensionnel de l'enzyme, être impliquée dans le mécanisme de la stéréospécificité de l'enzyme. Afin d'analyser le rôle de cette glutamine, nous avons étudié l'effet de la substitution de ce résidu par une arginine. Cette substitution a été réalisée par génie génétique, et la protéine mutante recombinante a été produite dans la bactérie *Escherichia coli* puis partiellement purifiée. Les mesures préliminaires d'activité en présence de pyruvate ont révélé une efficience catalytique environ 1000 fois inférieure à celle de la protéine sauvage. Il n'a pas été mis en évidence d'activité en présence de D-lactate. Le rôle de la glutamine 102 ne serait donc pas fondamental dans le processus de reconnaissance des stéréoisomères L(+) et D(-) du lactate, comme cela a été suggéré pour les lactate déshydrogénases bactériennes.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Décembre 1992
Promoteur : E. Feytmans

Liste des Abréviations

AA	acide aminé
ADN	acide désoxyribonnucléique
ARN	acide ribonucléique
ARN_m	acide ribonucléique messager
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine de sérum bovin
ddNTP	didésoxyribonucléotide
dNTP	désoxyribonucléotide
DEAE	diéthyl aminoéthane
D-LDH	D-Lactate déshydrogénase
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
3D	tridimensionnel
EDTA	éhylènediamine-tétraacétate
FBP	fructose 1,6 biphosphate
FPLC	chromatographie rapide de protéines en phase liquide
kDa	kilodalton
K_m	constante d'affinité
K_{cat}	constante de vitesse catalytique
K_{cat}/K_m	efficience catalytique
LDH	Lactate déshydrogénase
L-LDH	L-Lactate déshydrogénase
MOPS	acide 3-(N-morphinol) propane sulfonique
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite
NAD^+	nicotinamide adénine dinucléotide sous forme oxydée
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate réduit
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide
PEG	polyéthylène glycol
pb	paire de base
PM	poids moléculaire
RNase	ribonucléase
SDS	sodium dodécyl sulfate
TRIS	tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
V_{max}	vitesse maximale
v/v	volume/volume
w/v	poids/volume

Liste d'abréviations des acides aminés (AA)

Amino acid	*Three-letter abbreviation*	*One-letter symbol*
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Asparagine or aspartic acid	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glutamine or glutamic acid	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

1. L'ingénierie enzymatique 1

1.1. Généralités 1

1.2. Facteurs d'amélioration de la synthèse enzymatique 1

1.2.1. L'augmentation de la stabilité de l'enzyme 1

1.2.2. L'amélioration des conditions d'immobilisation de l'enzyme 2

1.2.3. Modification des propriétés catalytiques de l'enzyme par ingéniérie génétique 2

1.2.4. Le génie génétique 2

1.2.5. La stéréospécificité 3

1.2.6. La synthèse *de novo* 4

2. Situation de la LDH dans le métabolisme 4

3. Description des lactate déshydrogénases 6

3.1. L-lactate déshydrogénases NADH-dépendantes de procaryotes (npL-LDH) 6

3.2. L-lactate déshydrogénases NADH-dépendantes d'eucaryotes (neL-LDH) 7

3.3. D-lactate déshydrogénases NADH-dépendantes de procaryotes (npD-LDH) 7

3.4. D-lactate déshydrogénases NADH-dépendantes d'eucaryotes (neD-LDH) 7

3.5. D/L-lactate déshydrogénases NADH-indépendantes de procaryotes (iLDH) 8

3.6. Lactate racémases 8

4. Les isozymes de L-LDH de vertébrés 8

5. Description de la structure tridimensionelle de la L-LDH 10

5.1. L-LDH de muscle de roussette 11

5.2. L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* 12

5.3. L-LDH de muscle de lapin 14

5.4. Le site actif 14

5.4.1. Localisation générale 14

5.4.2. Les changements conformationnels 14

6. La tétramérisation 15

7. Comparaison entre D-LDH et L-LDH 16

8. Le mécanisme catalytique 17

8.1. Le couple His/Asp 18

8.2. Le NADH 19

9. Les principaux inhibiteurs de L-LDH 19

10. Les mutations réalisées sur des L-LDH et leurs principaux effets 20

11. But du mémoire 24

MATERIEL ET METHODES 25

1. Matériel 25

1.1. Solutions 25

1.2. Tampons 26

1.3. Milieux de culture pour bactéries 28

1.3.1. Milieux riches 28

1.3.2. Milieu minimum 29

1.3.3. Milieux solides pour phages 29

1.4. Souches de bactéries 30

1.5. Plasmides 30

1.5.1. pGRtM12 30

1.5.2. pOTSncol2 30

1.5.3. pGIPM10 30

1.6. Phages 31

1.6.1. M13mp18 31

1.6.2. M13LDH 31

2. Méthodes 31

2.1. Techniques relatives à l'ADN 31

2.1.1. Préparation de vecteurs d'ADN 31

2.1.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique 31

2.1.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique 32

2.1.1.3.Minipréparation d'ADN de phage M13 double brin sous forme réplicative 32

2.1.1.4. Midipréparation d'ADN de phage M13 double brin sous forme réplicative 32
2.1.1.5. Maxipréparation d'ADN de phage M13 simple brin 33
2.1.1.6. Maxipréparation de simple brin uracilé 33
2.1.1.7. Extraction au phénol 34
2.1.1.8. Précipitation d'ADN 35
2.1.1.9. Electrophorèse d'ADN 35
2.1.1.10.Restriction 36
2.1.1.11. Récupération de fragments d'ADN sur gel d'agarose 36
2.1.1.11.1. Méthode "Prep-A-Gene" (BIO-RAD) 36
2.1.1.11.2. Méthode de Dretzen 37
2.1.2. Ligation 37
2.1.3. Transformation 38
2.1.3.1. Cellules compétentes au $CaCl_2$ 38
2.1.3.2. Transformation de *E. coli* par le phage M13 38
2.1.3.3. Transformation par un plasmide 38
2.1.3.4. Cellules électrocompétentes (Cellules glycérolées) 39
2.1.3.5. Electroporation 39
2.1.4. Mutagenèse dirigée : Méthode de Kunkel 40

2.2. Techniques relatives aux protéines 41
2.2.1. Production de la LDH 41
2.2.2. Purification de la LDH de muscle de lapin : méthodes chromatographiques 41
2.2.2.1. Chromatographie d'affinité 41
2.2.2.2. Chromatographie sur tamis moléculaire 42
2.2.3. Dosage colorimétrique des protéines 42
2.2.4. Dosage des protéines à 280 nm 42
2.2.5. Dosage de l'activité de la LDH 43
2.2.6. Electrophorèse en gel SDS-polyacrylamide 43

RESULTATS 45

1. Introduction 45

2. Mutagenèse dirigée 46

2.1. Choix de la séquence de l'oligonucléotide de mutagenèse 46

2.2. Préparation de simple brin uracilé 46

2.3. Réaction de mutagenèse dirigée 46

2.4. Recherche des mutants 47
3. Construction de pINT 47
3.1. Stratégie 47
3.2. Préparation de la matrice 48
3.3. Préparation de l'insert 48
3.4. Ligation et transformation 48
3.5. Recherche de la construction pINT 48
4. Construction de pV3 49
4.1. Stratégie 49
4.2. Préparation de la matrice 49
4.3. Préparation de l'insert 50
4.4. Ligation et transformation 50
4.5. Recherche de la construction 50
4.6. Conclusion 51
5.Production et purification 52
5.1. Production 52
5.2. Estimation de la concentration totale en protéine de la fraction obtenue (Test de Folin) 52
5.3. Vérification de la production par électrophorèse 52
5.4. Purification partielle 53
5.5. Estimation de la concentration totale en protéine de la fraction partiellement purifiée 53
5.6. Vérification de la purification par électrophorèse 53
6. Caractérisation cinétique préliminaire de la L-LDH Q102R 54
6.1. Mesure des constantes cinétiques de la protéine mutante en présence de pyruvate 54
7. Conclusions et perspectives 55

Introduction

1.L'ingénierie enzymatique

1.1.Généralités

La synthèse chimique permet la construction de molécules, existant ou non dans la nature, intéressantes pour l'homme (pesticides, médicaments, nutriments, ...). Dans le domaine pharmaceutique, de nombreuses substances, comme l'aspirine, sont actuellement produites par cette voie.

Mais la synthèse chimique peut être, pour certains produits, complexe, lente, coûteuse (réactifs, réactions, purifications,...) et provoquer l'apparition de substances toxiques (stéréoisomères,...).

Suite aux progrès de la génétique et de la biochimie, il est devenu possible de faire produire par un microorganisme (bactérie ou levure) une enzyme. Cette enzyme pourrait agir comme un laboratoire de chimie organique de quelques nanomètres (nm) et catalyser la transformation des substrats en produits. Il est même possible d'immobiliser cette enzyme sur une colonne de type échangeur d'ions (Les enzymes, P. Monsan, 1982), ce qui permettrait d'obtenir à la sortie de la colonne le produit de la réaction enzymatique de façon continue.

Cependant, des améliorations sont envisageables afin de permettre à la synthèse par voie enzymatique de devenir réellement plus avantageuse que la synthèse chimique.

1.2.Facteurs d'amélioration de la synthèse enzymatique

1.2.1.L'augmentation de la stabilité de l'enzyme

La liste des conditions provoquant une inactivation des enzymes est longue, et inclue les pH extrêmes, la présence de protéases ou de dénaturants forts (urée) et les hautes températures. Les mécanismes de thermoinactivation sont particulièrement intéressants pour les industries (alimentaire par exemple) puisque des températures élevées (de l'ordre de

65°C voire même de 100°C) engendrent une réduction de la contamination bactérienne et de la viscosité, combinée à un taux de réaction plus élevé (A. Klibanov et T. Ahern , 1987). L'α-amylase, par exemple, est particulièrement thermostable puisqu'elle garde une efficience catalytique élevée à des températures proches de 110°C.

1.2.2.L'amélioration des conditions d'immobilisation de l'enzyme

La fixation de l'enzyme à un support, généralement par des liaisons covalentes, peut entraîner une rigidification de la protéine, et provoquer une diminution de l'efficience catalytique (Les enzymes, 1982). On pourrait, par exemple, améliorer le rendement de l'enzyme immobilisée en changeant le microenvironnemnt de celle-ci.

1.2.3.Modification des propriétés catalytiques de l'enzyme par ingéniérie génétique

Le véritable défi consiste à modifier la spécificité de l'enzyme. La réaction ainsi que son mécanisme ne changent pas fondamentalement, mais l'affinité d'un enzyme pour un substrat donné est modifiée.

1.2.4.Le génie génétique

La plupart des gènes comprennent une partie codante (Open Reading Frame) qui, après transcription en ARNm va être traduite en une protéine. Trois bases de l'ARN (codon) codent pour un acide aminé (AA). Un changement d'une, deux ou trois bases du codon entraîne éventuellement la modification (mutation) d'un AA. Dans le cas contraire, la mutation est dite muette (Lewin). Cette modification va avoir sur la nouvelle protéine synthétisée, ou protéine mutante, des effets d'importance variable selon le type de changement d'AA et l'emplacement de l'AA modifié dans la protéine.

La mutagenèse aléatoire ne semble pas être la méthode la plus adéquate pour le changement ciblé des caractéristiques de l'enzyme (Clarke et al., 1991). L'outil principal utilisé pour obtenir une enzyme mutée spécifiquement est donc la mutagenèse dirigée. Cette technique

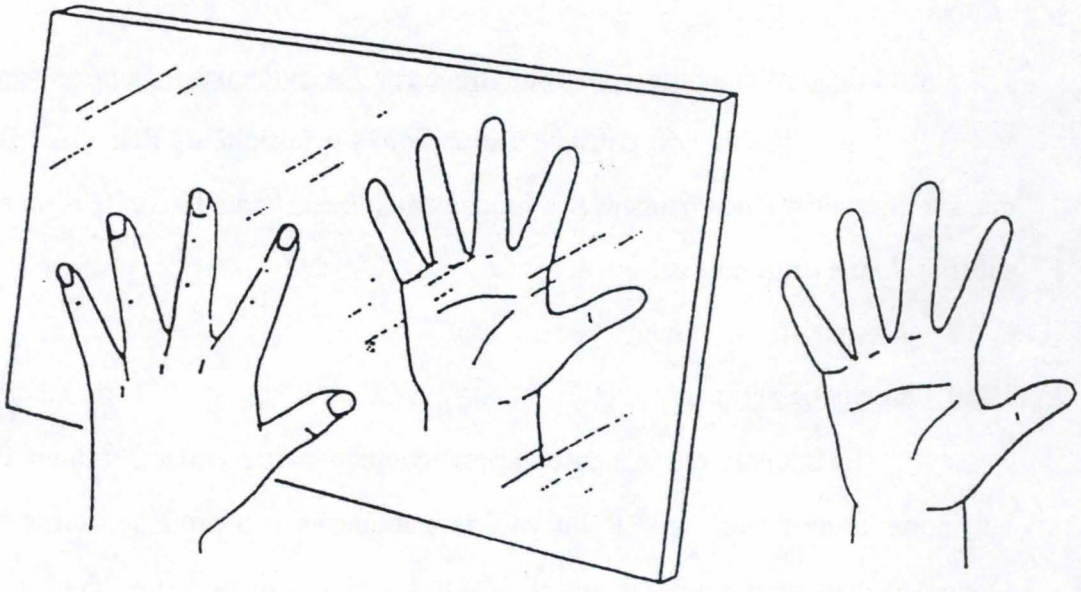


Figure 1.1

consiste à modifier de manière ponctuelle (quelques bases) l'ADN, de façon à ce que celui-ci code pour une protéine légèrement différente de la protéine native.
La mutagenèse dirigée peut être utilisée pour atteindre différents objectifs tels que l'étude du rôle d'un AA particulier. Ceci permet, avec l'appui de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, de présumer du mécanisme catalytique de l'enzyme.

Cette technique peut également servir à l'étude de certaines propriétés de l'enzyme, en utilisant la charpente protéique pour recréer une enzyme capable d'accomplir une tâche légèrement différente de sa fonction naturelle. La L-lactate déshydrogénase (L-LDH) de *Bacillus stearothermophilus*, par exemple, s'avére être un excellent modèle de base en raison de sa stabilité, son efficience catalytique, sa stéréospécificité, son coût peu élevé et le couplage possible avec une enzyme régénératrice de NADH (Dunn et al., 1991). De plus, la plupart des tentatives pour modifier cette L-LDH ont donné de bons résultats : Wilks et ses collaborateurs (1988) ont modifié la L-LDH en une enzyme proche de la malate déshydrogénase (MDH), Feeney et ses collaborateurs (1989) ont converti cette même L-LDH NADH-dépendante en une NADPH-dépendante, l'équipe de Wilks (1990) a élargi la spécificité de cette LDH vis-à-vis des substrats à chaîne aliphatique plus large. Cette dernière modification est importante car les produits d'intérêt pharmaceutique ont souvent une chaîne aliphatique plus longue que le groupe méthyl du pyruvate.

1.2.5. La stéréospécificité

On appelle stéréoisomères, des composés qui ont la même constitution moléculaire, mais qui diffèrent par la disposition de certains de leurs atomes dans l'espace (Hart et Conia). De manière plus restrictive, si deux molécules sont l'image l'une de l'autre dans un miroir, on les appelle des énantiomères (figure 1.1). Dans le cas du lactate par exemple, les deux seuls stéréoisomères possibles sont des énantiomères, car ce composé possède un seul carbone asymétrique. Les propriétés d'un stéréoisomère par rapport à un autre peuvent varier fortement. Dans le domaine pharmaceutique, il est parfois indispensable de ne produire qu'un type de stéréoisomère et même, d'éviter la formation de

Vue générale de la glycolyse

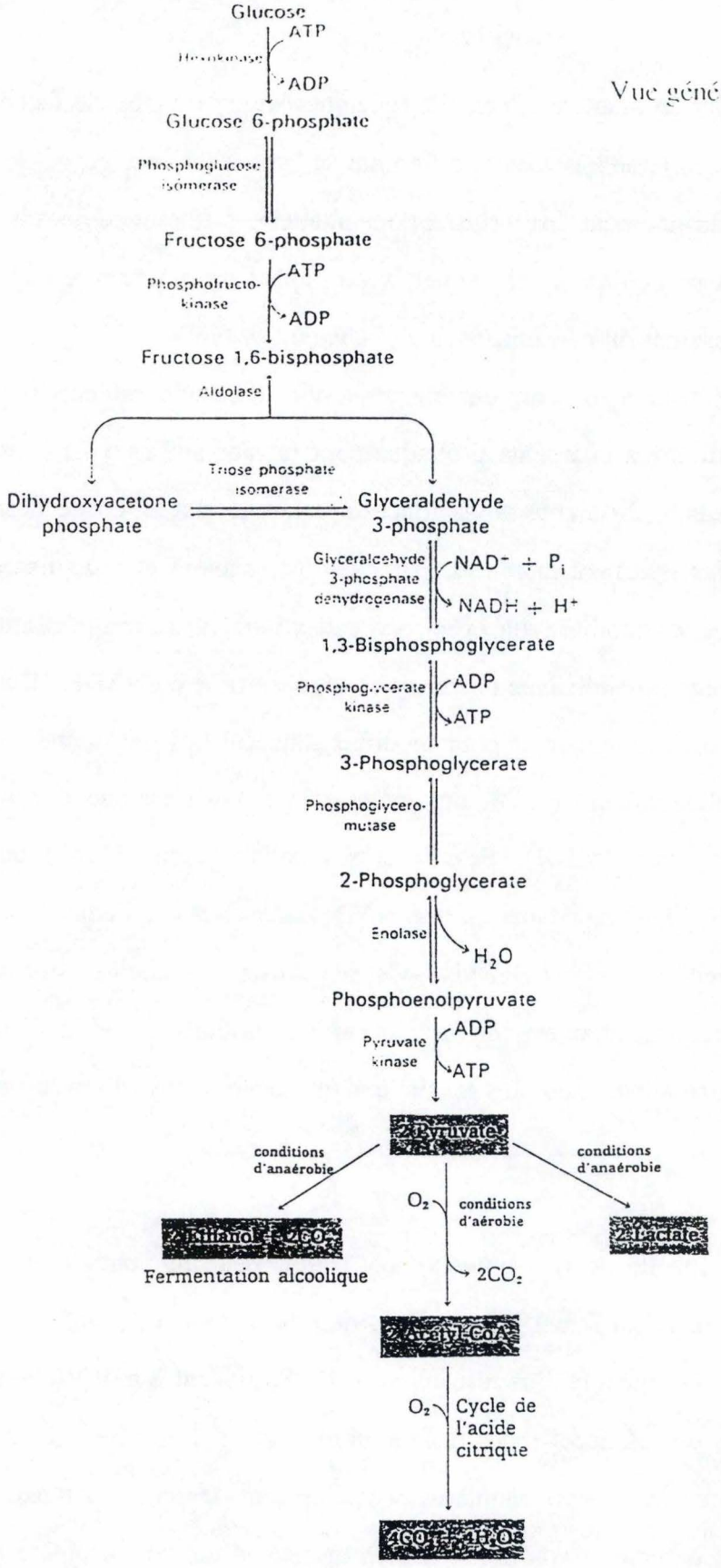


Figure 2.1

l'autre (difficile par synthèse chimique). Ce problème est résolu dans la nature, car certaines enzymes sont capables de transformer un substrat donné en un seul stéréoisomère du produit, généralement de manière exhaustive. Ils sont appelés stéréospécifiques.

1.2.6. La synthèse *de novo*

Il est à noter qu'une autre voie permettant la transformation de composés d'intérêt est actuellement suivie. Elle consiste en une synthèse de séquences peptidiques (*de novo*) à partir d'un assemblage de ses éléments de bases, les AA. Mais cette méthode fait face à de nombreux problèmes dont un temps de synthèse très long (plus d'une heure par résidu) et une dégradation des protéines (Dunn et al., 1991). Cependant, une alternative existe, il s'agit de synthétiser un gène qui est ensuite cloné et exprimé.

2. Situation de la LDH dans le métabolisme

Tout être vivant a besoin d'énergie pour maintenir son état ordonné, thermodynamiquement instable. Dans un premier temps, c'est lors de la glycolyse que la cellule va prendre cette énergie, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La glycolyse est une succession de 10 réactions dans lesquelles le glucose est catabolysé en 2 pyruvates avec un bilan énergétique de production de 2 ATP et 2 NADH (Lehninger, 1985).

Trois possibilités s'offrent alors à la cellule (fig. 2.1).

- La dégradation aérobie complète du pyruvate en CO_2 et H_2O permet la libération d'énergie stockée sous la forme de 30 ATP. Cette voie est empruntée par le pyruvate dans les cellules aérobies animales et végétales (Lehninger, 1985).

-La fermentation alcoolique correspond à la transformation anaérobie du pyruvate en éthanol et en CO_2; elle est réalisée dans certains micro-organismes comme la levure de bière.

-La troisième voie, celle qui nous préoccupera plus particulièrement, est la glycolyse anaérobie. Lorsque certains tissus animaux manquent d'oxygène, l'oxydation du pyruvate devient impossible, et la seule façon de régénérer le NAD^+ (nécessaire à la glycolyse) consiste en une transformation du pyruvate en lactate. Le lactate est aussi le produit de la glycolyse des micro-organismes anaérobies qui assurent une fermentation lactique.

Mais, que ce soit lors de la glycolyse anaérobie ou de la fermentation lactique, c'est la même enzyme qui transforme le pyruvate en lactate, en l'occurrence la **lactate déshydrogénase** (LDH). La LDH est stéréospécifique, et suivant que le produit de la réaction sera du L(+)lactate ou du D(-)lactate, nous serons en présence d'une L-LDH ou d'une D-LDH (fig. 2.2).

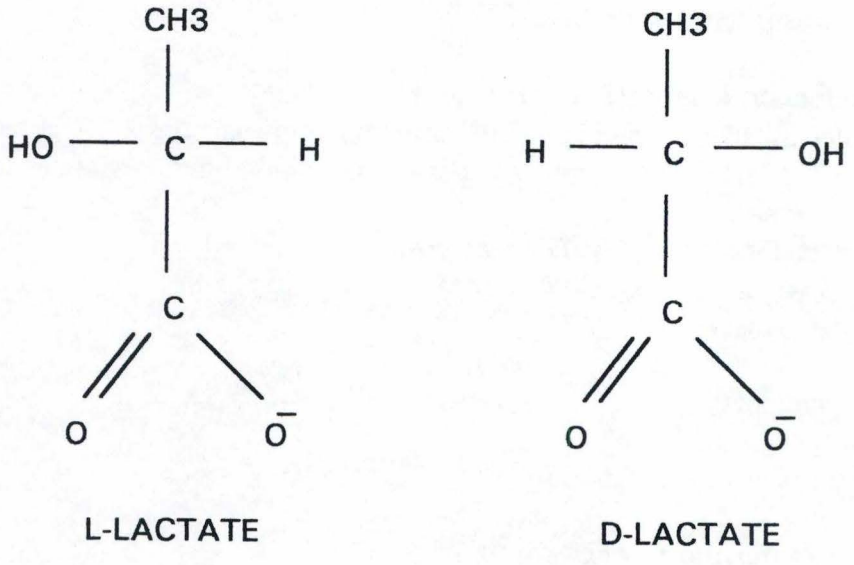


fig. 2.2

Les micro-organismes, les animaux et les végétaux possèdent tous, soit une L-LDH, soit une D-LDH, soit les deux. Les vertébrés ne possèdent que la L-LDH, dont le rôle dans la glycolyse anaérobie a été cité plus haut, et qui catalyse la réaction suivante :

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \quad <===> \quad \text{L-lactate} + NAD^+ \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -6{,}0 \text{ kcal/mol}$$

Tableau 3.1 : npL-LDH

---> **Bacillus stearothermophilus(BACST) :** *Clarke/Holbrook 90 et Jones 92 et Luyten 89*
Thermophile, 317 aa, homologie >90% avec BAC caldolyticus et caldotenax, très stable
Structure 3D connue(Zuber 90).

---> **Bacillus caldolyticus :** *Zuber 87*
Thermophile, 317 aa.

---> **Bacillus caldotenax :** *zuber 87*
Thermophile, 317 aa.

---> **Thermus caldophilus(THECA) :** *Ohta 89*
Hautement thermophile, 310 aa.

---> **Thermus aquaticus YT-1(THEAQ) :** *Ohta 90*
Hautement thermophile, 310 aa, PM 33210, homologie >87% avec Thermus caldophilus.

---> **Lactobacillus casei(LACCA) :** *Hottinger 92*
325 aa, crystallisée par Buchner et Hecht en 1984.

---> **Lactobacillus plantarum :** *Ohta 92*
325 aa.

---> **Bifidobacterium longum(BIFLO) :** *Ohta 89*
320 aa, régulée allostériquement par FBP comme la plus part des L-LDH bactériennes à l'opposé des L-LDH des vertébrés. On pense que l'anion binding site des vertébrés correspond à ce site.

---> **Streptococcus mutans(STRMU) :** *Duncan 91*
328 aa, homologie aa avec LACCA >65%

---> **Bacillus coagulans :**
Mésophile.

---> **Bacillus firmus :**
Mésophile.

---> **Bacillus megaterium :** *Zuber 86*
Mésophile.

---> **Bacillus megaterium :** *Zuber 86*
Mésophile.

---> **Bacillus psychrosaccharolyticus(BACPS) :** *Zuber 90*
Psychrophile, 318 aa, PM 35254, homologie >75% pour Psychrophile et > 70% pour Thermophile; par contre l'homologie pour les séquences Mésophiliques >60% seulement.
Les variations structurales des LDH ne seraient t'elles pas semblables pour les LDH résistants à des hautes températures ou à des basses températures?

---> **Bacillus subtilis(BACSU) :** *Zuber 87*
316 aa, Psychrophile.

---> **Bacillus maroccanus :** *Kriech 84*
Psychrophile.

Ce bilan, fortement négatif, nous montre que la réaction est déplacée vers la droite dans des conditions standard de pH (7) et de température (25 °C) (Lehninger, 1985).

3.Description des lactates déshydrogénases

3.1.L-lactate déshydrogénases NADH-dépendantes de procaryotes (npL-LDH)

Les bactéries produisant ce type d'enzyme ont la possibilité de réaliser la fermentation lactique (ex: *Lactobacillus*; Garvie et al., 1980). Actuellement, les séquences de 15 npL-LDH (tableau 3.1) sont connues, mais seulement deux d'entre elles sont cristallisées (*Bacillus stearothermophilus* et *Lactobacillus casei*). Cela a permis, après analyse aux rayons X, de connaître leur structure tridimensionnelle.

Les npL-LDH bactériennes ne fonctionneraient *in vivo* que dans le sens pyruvate ---> lactate pour régénérer le NAD^+ nécessaire à la glycolyse (Garvie et al., 1980). Certaines bactéries produisent du lactate de manière constitutive; elles sont du type homolactique (ex : *Lactobacillus casei*). D'autres bactéries produisent du lactate sous certaines conditions seulement; on les appelle bactéries hétérolactiques (ex : *Bacillus subtilis*). (Garvie et al., 1980).

Les L-LDH bactériennes sont activées allostériquement par le fructose 1,6 biphosphate (FBP).

Certaines bactéries, *Thermus aquaticus* par exemple, sont capables de résister à des températures supérieures à 80°C, ce qui sous-entend que leur machinerie enzymatique est stable à ces températures. Ces enzymes sont appelées thermorésistantes ou thermophiles (Zhang et al.,1992). Les enzymes inactives à ces hautes températures sont appelées mésophiles ou psychrophiles si elles sont plus actives à basse température. Les substitutions observées entre ces différentes enzymes sont l'objet de multiples études (Schlatter et al., 1987; Zulli et al., 1990). Les séquences des L-LDH psychrophiles sont plus proches des L-

Tableau 3.2 : neL-LDH

---> **Human(Heart)** : 333 aa

---> **Human(Muscle)** : 331 aa

---> **Human(Testis)** : 331 aa

---> **Chick(Muscle)** : 331 aa

---> **Chick(Heart)** : 332 aa

---> **Rabit(Muscle)** : 332 aa

---> **Rabit(Heart)** : 217 (partielle) aa

---> **Rat(muscle)** : 332 aa

---> **Rat(Testis)** : 330 aa

---> **Mouse(Muscle)** : 331 aa

---> **Mouse(Heart)** : 333 aa

---> **Mouse(Testis)** : 331 aa, crystallisée par Hogrefe en 1987.

---> **Pig(Muscle)** : 331 aa, structure crystallo non publiée.

---> **Pig(Heart)** : 333 aa, crystallisée par Grau en 1981.

---> **Bovin(Muscle)** : 331 aa

---> **Dogfish(Muscle?)** : 329 aa, structure crystallo raffinée en 1987 par Abad-Zapeto.

---> **Plante graminée(HorvuA)** : 356 aa

---> **Plante graminée(HorvuB)** : 344 aa

---> **Canard domestique(HeartAnapl)** : 332 aa

---> **Poisson Killi(HeartFunhe)** : 334 aa

Tableau 3.3 : npD-LDH

---> **Lactobacillus Plantarum** : *Ohta 91*

---> **Lactobacillus bulgaricus** : *Garel 91 et Hottinger 92*

---> **Lactobacillus helveticus** : *Hottinger 92*

LDH thermophiles que des L-LDH mésophiles (Zuber et al., 1987), mais cette proximité phylogénétique apparente reste inexpliquée.

3.2. L-Lactate déshydrogénases NADH-dépendantes d'eucaryotes (neL-LDH)

Les L-LDH des mammifères ont été particulièrement bien étudiées. Elles sont fort semblables aux npL-LDH des bactéries au niveau de leur séquence, de leur structure, de leur mécanisme catalytique et donc de leurs propriétés cinétiques. 17 séquences (tableau 3.2) sont disponibles dans la base de données GenEmbl.

Le rôle principal des L-LDH des vertébrés est, tout comme chez les procaryotes, de régénérer le NAD^+ en l'absence d'O_2, mais certaines différences de fonction interviennent selon le tissu considéré, comme les différents isozymes.

3.3. D-lactate déshydrogénases NADH-dépendantes de procaryotes (npD-LDH)

Les npD-LDH catalysent la réaction de transformation du pyruvate en D-lactate et utilisent le NADH comme cofacteur. Trois séquences de npD-LDH sont actuellement publiées, mais aucune d'entre elles n'a été cristallisée (tableau 3.3). Leur rôle dans le métabolisme bactérien serait le même que les npL-LDH bien que ces deux enzymes à stéréospécificité opposée se trouvent parfois ensemble dans une espèce donnée de bactérie (ex: *Lactobacillus plantarum*).

NB: *Escherichia coli*, séquencée par Ho en 1992, est constituée de 517 résidus et est fort différente des autres npD-LDH. Elle s'apparente plutôt aux cytochromes.

3.4. D-lactate déshydrogénases NADH-dépendantes d'eucaryotes (neD-LDH)

Il existe également des D-LDH chez les eucaryotes. Laevis-Benbow a isolé, en 1989, une lactate déshydrogénase d'ovaire de grenouille (Xenopus) produisant du D-lactate. Il est vraisemblable que d'autres espèces d'amphibiens et différents eucaryotes peu évolués

dont les coelentérés et les mollusques comme *Patella caerulea* (Papadopoulos et al., 1990) possèdent aussi une D-LDH, mais actuellement, aucune D-LDH de ce type n'a été séquencée. Certains crustacés, comme le crabe *Eriocher sinensis* (Long et Kaplan, 1973), produisent aussi une D-LDH mais, tout comme les précédentes, aucune de ces enzymes n'a été séquencée. Il est difficile de savoir si ces neD-LDH s'apparentent aux npD-LDH bactériennes ou aux neL-LDH.

3.5. D/L-lactate déshydrogénases NADH-indépendantes de procaryotes (iLDH)

Certaines lactate déshydrogénases fonctionnent sans NADH: on les appelle NADH-indépendantes (Garvie 80). Il semblerait que ces protéines contiennent un noyau flavine et auraient surtout un rôle dans la transformation du lactate en pyruvate. Les iLDH sont produites en faible quantité et certaines sont associées à la membrane cellulaire (Garvie 80). Ces protéines sont peu connues, autant au niveau biochimique que génétique, mais il est fort probable que leur structure ainsi que leur mécanisme catalytique sont radicalement différents des autres LDH.

3.6. Lactate racémases

Certaines bactéries possèdent une lactate racémase, enzyme permettant la conversion du L-lactate en D-lactate et inversément. Cette lactate racémase n'a été mise en évidence que chez quelques bactéries et est peu connue. Son rôle pourrait consister en une transformation du produit (lactate) de la catalyse enzymatique, ce qui permettrait de déplacer l'équilibre en faveur de la formation du L ou D-lactate (Garvie et al., 1980)

4. Les isozymes de L-LDH de vertébrés

Il existe, chez les vertébrés, des isozymes (ou isoenzymes) de L-LDH, c'est-à-dire des formes d'une enzyme qui diffèrent les unes des autres par leur affinité pour le

Tableau 4.1

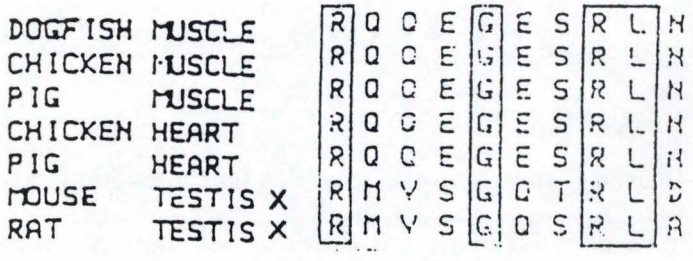
	% similarité (aa)
H de lapin et H humaine	89
H de lapin et M de lapin	71,5
H humaine et M humaine	75

Sass, 1989

Tableau 4.2

	% d'aa différents de X de rat	% d'aa différents de M de roussette
M de roussette	36,6	0
M de poulet	38,3	21,3
M de porc	31,2	22,8
H de poulet	39	28,2
H de porc	36,3	28,8
X de souris	9,6	37,5
X de rat	0	36,6

Li, 1983



Alignement de 7 séquences de L-LDH (residus 101 à 110) Figure 4.1

substrat, par la vitesse maximale de la réaction catalytique et par leurs propriétés régulatrices (Lehninger, 1985). Ces isozymes hétérotétramériques sont constitués de monomères de type M (muscle) et/ou de type H (coeur) correspondant respectivement aux gènes m et h. Il existe cependant un troisième type de monomère de L-LDH appelé X, codé par le gène x. Ce type est exprimé de façon majoritaire dans les testicules et permet la formation de l'homotétramère X4 (Li et al., 1983). Cinq autres isozymes peuvent se trouver dans le corps d'un vertébré, en l'occurrence M4, M3H1, M2H2, M1H3 et H4. Suivant le taux d'expression relatif des 2 gènes, un organe produira plus ou moins chacune de ces cinq classes d'isozymes. L'isozyme LDH M4 (majoritaire dans le muscle squelettique) favorise la réduction rapide de très faibles concentrations de pyruvate en L-lactate, tandis que l'isozyme H4 (majoritaire dans le coeur) favorise l'oxydation rapide du L-lactate en pyruvate (Lehninger, 1985). Les autres isozymes ont des propriétés cinétiques intermédiaires. Ces propriétés vont dans le sens du rôle physiologique de ces organes.

Sass et ses collaborateurs (1989) ont proposé un arbre évolutif de ces 3 types de L-LDH en étudiant les substitutions des résidus. Les résultats montrent que les séquences d'un même type de sous-unités M, H ou X d'espèces différentes sont plus proches que les séquences des sous-unités M, H ou X d'une même espèce (tableau 4.1). De plus, les monomères H et M sont plus proches entre eux qu'ils ne le sont du groupe X (tableau 4.2). Sur base des comparaisons entre les séquences des 3 types de L-LDH, d'autres constatations peuvent être faites: les résidus NH2-terminaux (1 à 20) sont très variables, la zone de fixation du coenzyme (21 à 95 et 118 à 163) est plus conservée que le domaine de fixation du substrat (164 à 333) et la région correspondant à la boucle du site actif (résidus 102 à 109) est fortement modifiée dans le type X (figure 4.1).

En 1977, Eventoff et ses collaborateurs tentent d'expliquer les modifications structurales entraînant ces différences d'affinité pour le substrat entre les isozymes. Ils concluent, après comparaison entre les structures tertiaires de L-LDH de muscle de roussette et de testicule de souris, que la plus grande différence entre les isozymes de L-

LDH ne se situe pas au niveau de leur structure tridimensionnelle dans un état donné mais dans les changements conformationnels pendant la catalyse.

Voici par exemple une des principales modifications entre les type H et M et leurs effets sur le fonctionnement de l'homotétramère correspondant: les résidus Met55, Ile96 et Ile119 du domaine de fixation du coenzyme de l'isozyme M4 sont remplacés respectivement par les résidus Leu, Val et Val dans l'isozyme H4. Ces changements seraient responsables d'une diminution de l'affinité de l'isozyme H4 pour le NADH par rapport à l'isozyme M4.

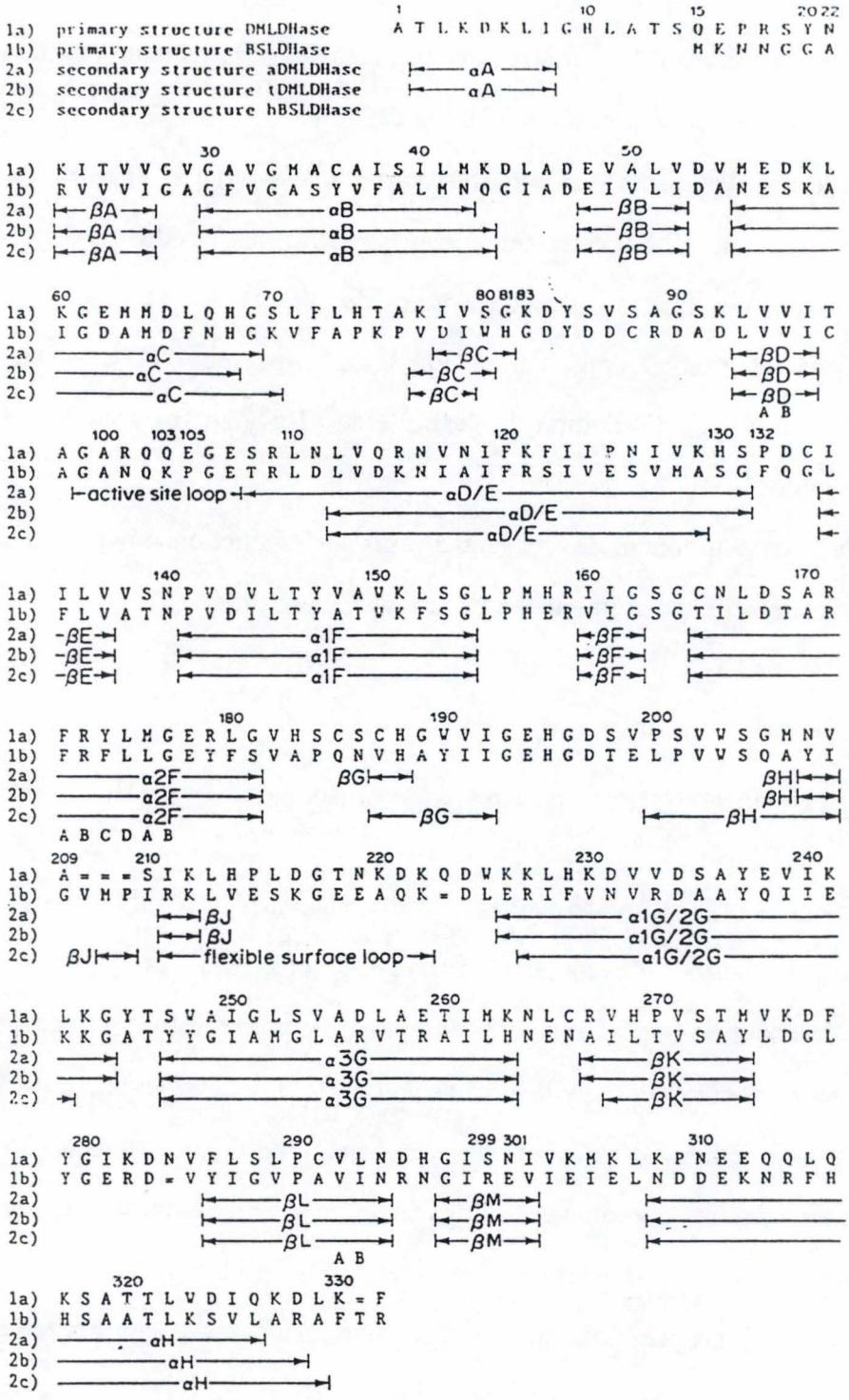
Ces modifications peuvent donner des renseignements sur le fonctionnement de l'enzyme et, en particulier, du site actif, au même titre que la mutagenèse dirigée.

5.Description de la structure tridimensionnelle de la L-LDH

Actuellement, les structures tridimensionnelles (3D) des L-lactate déshydrogénases de muscle de roussette (Abad-Zapatero, 87), de testicule de souris (Hogrefe, 87), de coeur de porc (Grau, 81), de muscle de porc (Holbrook, non publiée), de *Bacillus stearothermophilus* (Piontek, 90) et de *Lactobacillus casei* (Buchner et Hecht, 84) sont connues. Ces structures se trouvent dans une banque de données appelée Protein Data Bank (PDB) contenant les coordonnées cartésiennes des atomes lourds de ces protéines. Deux techniques permettent d'obtenir ces données.

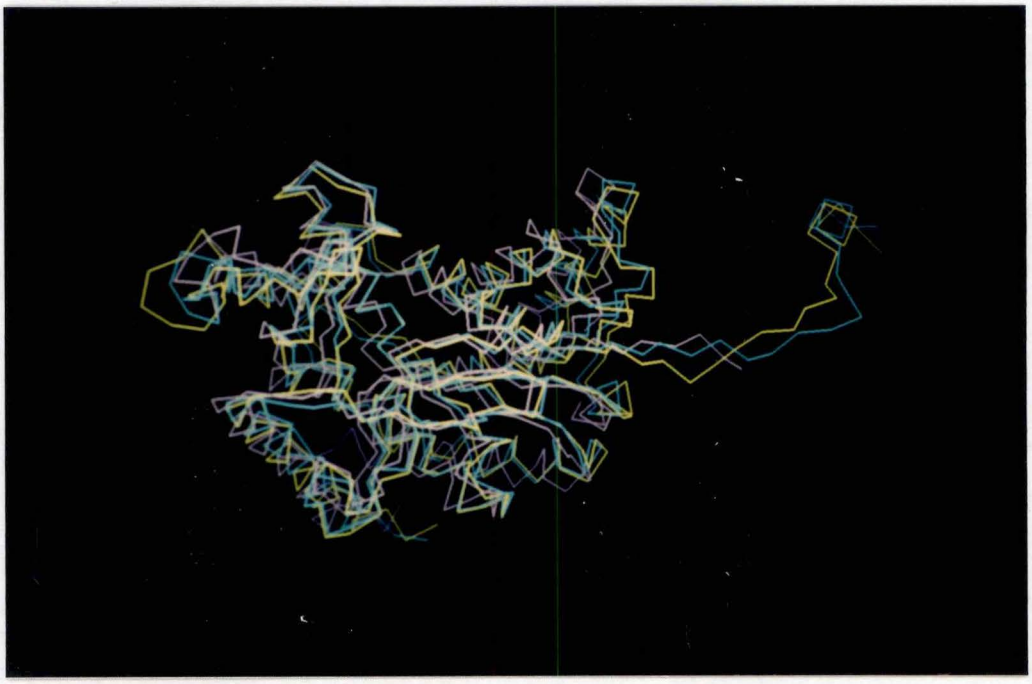
La **cristallographie** (diffraction de rayons X) nécessite une grande quantité de protéine soluble et purifiée afin d'obtenir des cristaux. Un mode opératoire spécifique pour chaque protéine rend cette technique lente et complexe et justifie le faible nombre de structures résolues (500) par rapport aux séquences connues (30.000).

La **résonance magnétique nucléaire** est utilisée pour des petites protéines (20.000 daltons) et nécessite la référence à une autre structure proche. Bien que les deux



Alignement de 2 séquences (1a: séquence de la L-LDH de muscle de roussette et 1b:séquence de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*) par Piontek et al.

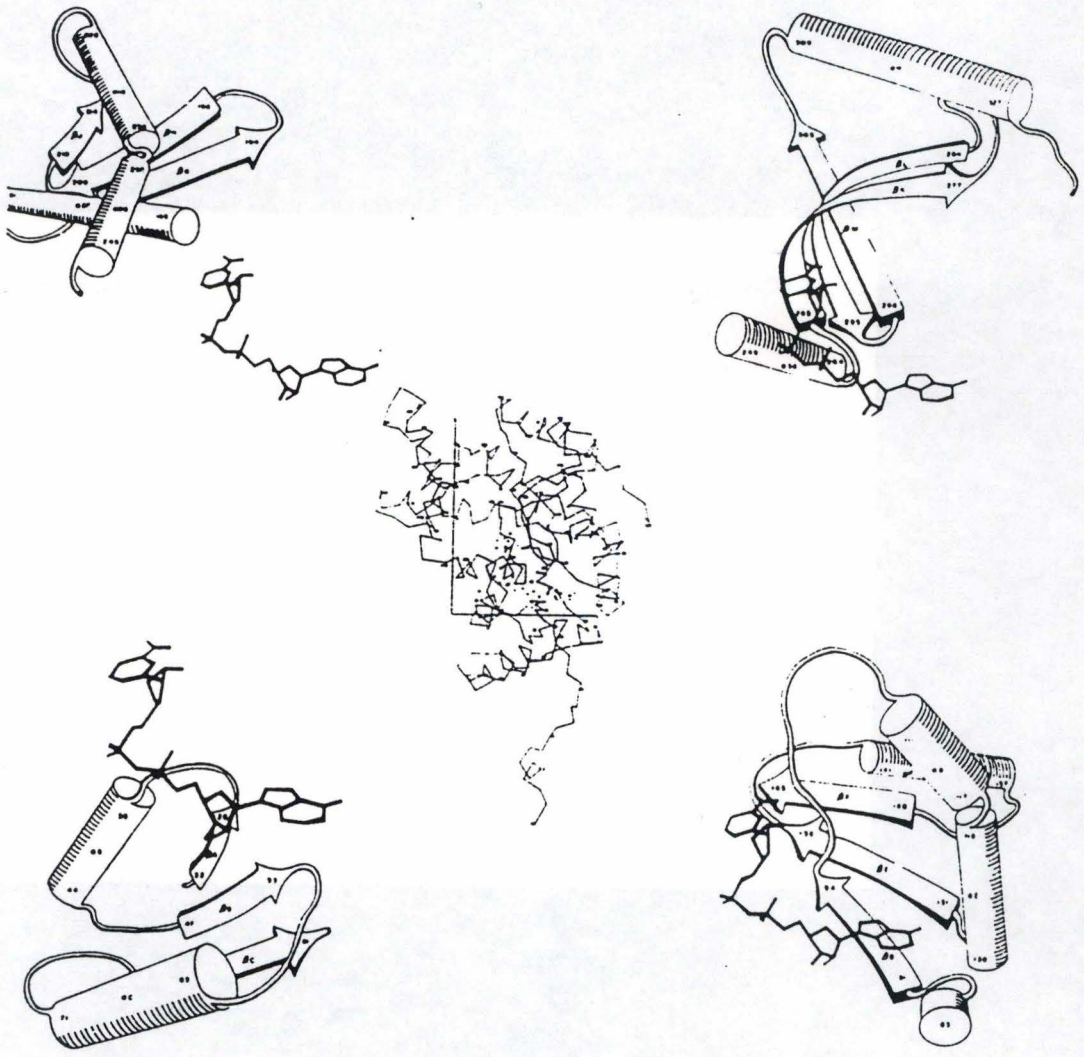
Figure 5.1



Mise en évidence des régions similaires des structures (Cα) des L-LDH de muscle de roussette (bleu), de *Bacillus stearothermophilus* (rose) et de muscle de lapin (jaune).

Figure 5.2

A1 Domaine catalytique A2



B1 Domaine coenzyme B2

Structure 3D éclatée de la L-LDH de muscle de roussette

Figure 5.3

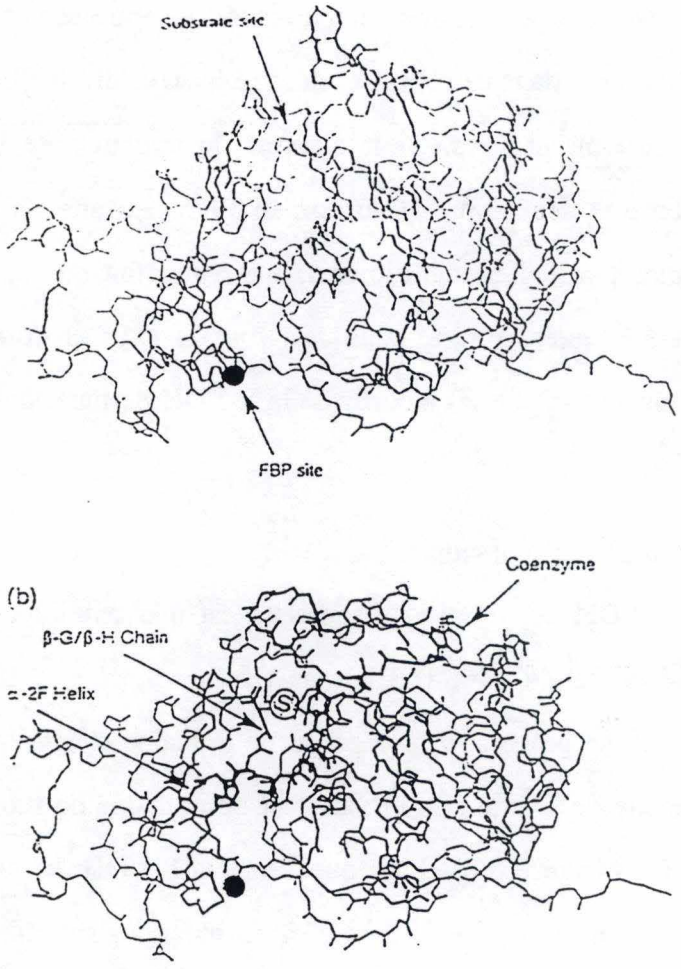
techniques soient complémentaires, la première est actuellement la plus complète pour l'investigation de la structure tridimensionnelle de la L-LDH.

La similarité entre les séquences (figure 5.1) des npL-LDH et neL-LDH est importante (Li et al.,1989) et se répercute par une similarité des structures (figure 5.2) (Piontek et al., 1990) qui permet une comparaison fine entre ces enzymes.

Nous allons, dans ce chapitre, décrire la structure tridimensionnelle de la lactate déshydrogénase de trois espèces. Tout d'abord, la structure de la L-LDH de muscle de roussette cristallisée et décrite par Holbrook en 1975. Ensuite, la structure 3D de *Bacillus stearothermophilus*, particulièrement intéressante par le fait que la quasi-totalité des résidus du site actif ont été mutés. Enfin, nous décrirons la L-LDH de muscle de lapin, modèle réalisé par C. Vinals (non publié) à partir de la L-LDH de muscle de porc.

5.1.L-LDH de muscle de roussette

La L-LDH de muscle de roussette est une oxydoréductase homotétramérique d'un poids moléculaire de 140.000 daltons (Holbrook et al., 1975). Chaque sous-unité (monomère), de forme globulaire, comprend un domaine catalytique (sous-domaines A1 et A2) contenant le site de fixation du substrat, et un domaine de fixation du coenzyme (sous-domaines B1 et B2) (figure 5.3). La séquence de la L-LDH de muscle roussette est longue de 329 résidus (Taylor et al., 1973) dont 23% forment des structures secondaires en feuillet β et 40% forment des hélices α. Le domaine catalytique (résidus 22 à 164) est quasi symétrique et est constitué de deux unités de repliement similaire, $\alpha\beta_3\alpha$, avec deux hélices α séparées par les trois brins antiparallèles d'un feuillet β. Ces deux sous-domaines A1 et A2 sont connectés par l'hélice α2G. Le domaine de fixation du coenzyme est formé par deux sous-domaines (B1 et B2) dont le motif "$\beta-\alpha-\beta-\alpha-\beta$" forme un feuillet β de six brins parallèles entouré par des hélices α (Bränden et al., 1980). La structure de cette L-LDH (résolution 0,28 nm) ne montre aucun pont disulfure.



Structure 3D (Cα) de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* (en haut: Boucle "ouverte" et en bas: Boucle "fermée")

Figure 5.4

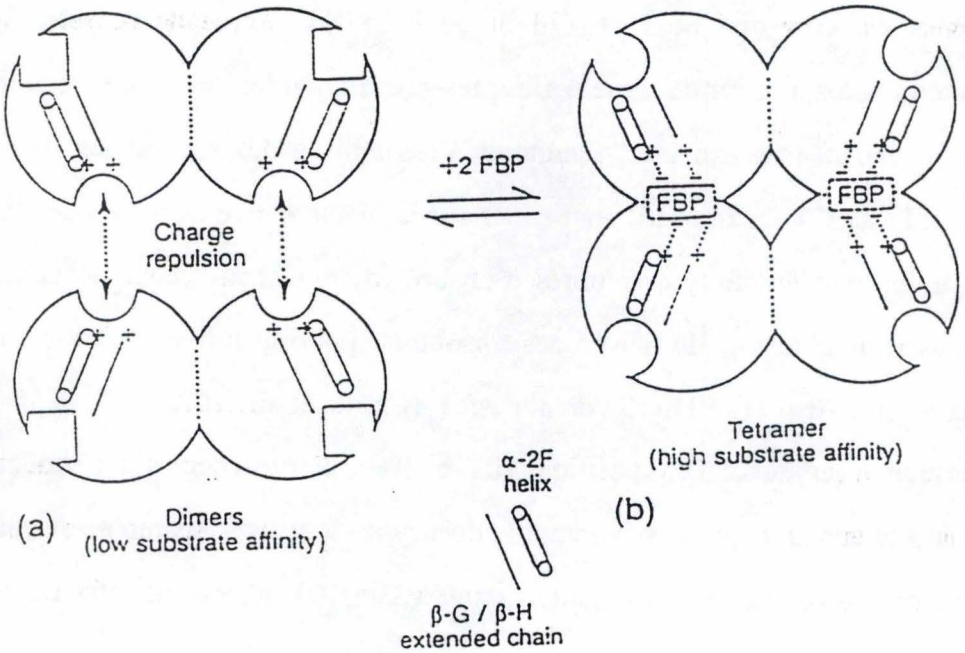
Lorsqu' on examine plus en détail la structure tertiaire, on remarque la présence d'un bras NH2-terminal long de 15 AA, formant une courte hélice α. Il semblerait que ce bras joue un rôle essentiel dans la stabilisation des tétramères de L-LDH eucaryotiques (Holbrook et Rossman, 1975). Adams et ses collaborateurs observent en 1973 deux pics dans la carte de densité électronique de l'apoenzyme, correspondant à la présence de 2 anions localisés dans 2 sites de fixation. Le premier site (composé de l'Arg171 et l'His195) est le site actif de l'enzyme, l'anion prenant la place du pyruvate en l'absence de celui-ci, et permettant une stabilisation du site actif. Le second site de fixation est appelé site de liaison de sous-unités et est constitué de l'Arg173 et de l'His188. Il aurait un rôle dans la formation des tétramères à partir de dimères: la présence d'un anion deux fois négatifs (par exemple $SO_3^=$) rendant le site neutre, faciliterait l'assemblage des sous-unités. L'Arg173 du second site et l'Arg171 du site actif sont situés sur la même hélice α, ainsi que l'His188 et l'His195 qui forment les deux extrémités d'un brin β. Un changement de la position spatiale des deux résidus du site de liaison des sous-unités pourrait influencer indirectement la position des résidus Arg171 et His195 du site actif (Clarke et al., 1985).

On remarque aussi, en position 102 à 109, la présence d'une boucle se refermant sur le site actif lorsque le substrat et le coenzyme sont fixés (complexe ternaire). Il y a sur cette boucle au moins 2 résidus (Arg109 et Gln102) qui ont un rôle important dans le site actif. Le repliement de cette boucle permet le positionnement idéal de ces résidus vis-à-vis du substrat (Clarke et al, 1986).

Il existe une autre boucle appelée boucle de surface ou "wing" 217-222, mentionnée par Piontek et ses collaborateurs en 1990, mais dont le rôle est inconnu.

5.2.L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*

La L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* (figure 5.4), également active sous la forme d'un homotétramère de 140000 Daltons, a été cristallisée en 1982 par Schar et collaborateurs avec une résolution inférieure à 0,25 nm, mais c'est en 1990 que Piontek et



Shéma représentant le mécanisme d'activation au FBP de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*

Figure 5.5

collaborateurs déterminent et raffinent la structure 3D de cette enzyme en utilisant celle de muscle de roussette (35% des résidus identiques). A partir de la structure de *Bacillus stearothermophilus*, mais aussi grâce aux données cinétiques, nous allons signaler les principales différences structurelles entre ces 2 enzymes très proches au niveau de la structure et de la séquence bien qu'éloignés d'un point de vue évolutif. Tout d'abord, le bras NH_2-terminal (14 résidus) est absent dans la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus.*

La boucle du site actif (résidus 102-109) ainsi que l'autre boucle flexible de surface (résidus 217-222) sont fortement changées dans *Bacillus stearothermophilus.*

Mais la principale différence entre les L-LDH de muscle de roussette et de *Bacillus stearothermophilus* est l'activation de cette dernière par le fructose-1,6-biphosphate (FBP). Pourtant, la comparaison du site d'activation de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* avec le site de fixation d'anion de la L-LDH de muscle de roussette correspondant ne montre aucune différence significative entre les résidus concernés dans ces sites (Piontek et al., 1990). La LDH procaryote est régulée de manière allostérique par le FBP. Lorsque la LDH est en concentration similaire à celle recontrée 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 charges positives se retrouvent opposées. Dans chaque monomère de LDH, il existe une poche contenant deux charges positives portées par deux résidus, en l'occurence Arg173 et His188, dans laquelle le groupe phosphate du FBP peut se placer (figure 5.5). Ces deux résidus forment l'extrémité de deux structures secondaires, une hélice α pour l'Arg173 et un feuillet β pour l'His188. Or, à 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.

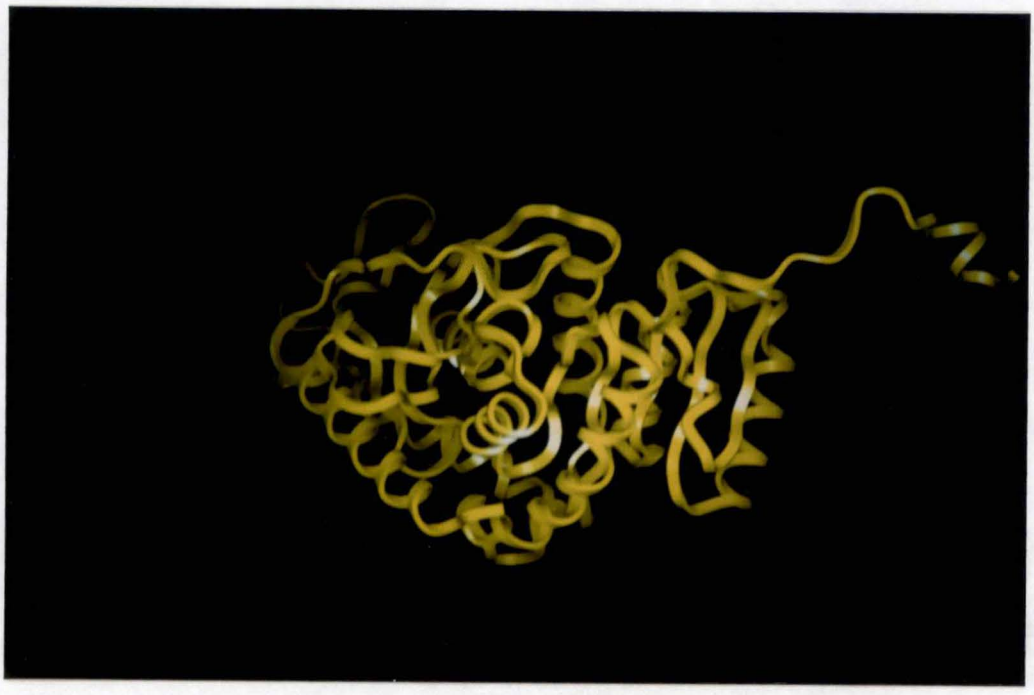


Figure 5.6

Modèle de la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin: les structures secondaires sont mises en évidence par un ruban qui délimite le squelette de la protéine.

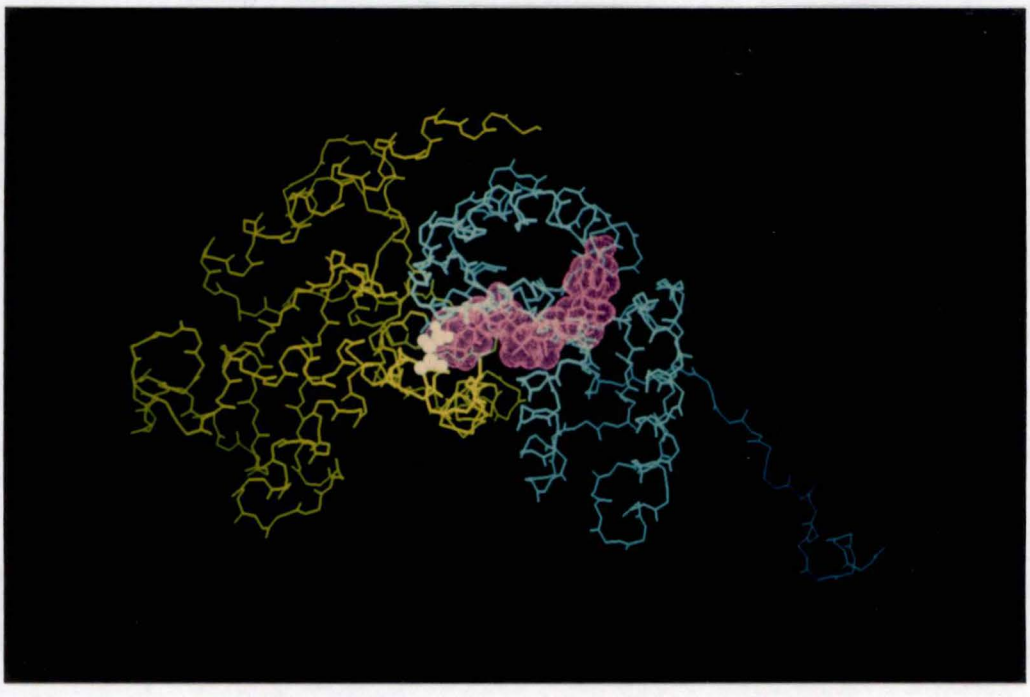


Figure 5.7

Modèle de la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin avec le domaine catalytique en jaune, le domaine de fixation du coenzyme en bleu, le NADH en rose et le pyruvate en blanc.

5.3.L-LDH de muscle de lapin

La L-LDH de muscle de lapin a été modélisée à partir de la L-LDH de muscle de porc (figure 5.6). La figure 5.2 représente une superposition des structures de L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*, de muscle de roussette et de muscle de lapin. La ressemblance entre ces structures paraît évidente. Aucune différence structurale significative entre les deux L-LDH de vertébré n'est décelée.

5.4.Le site actif

5.4.1.Localisation générale

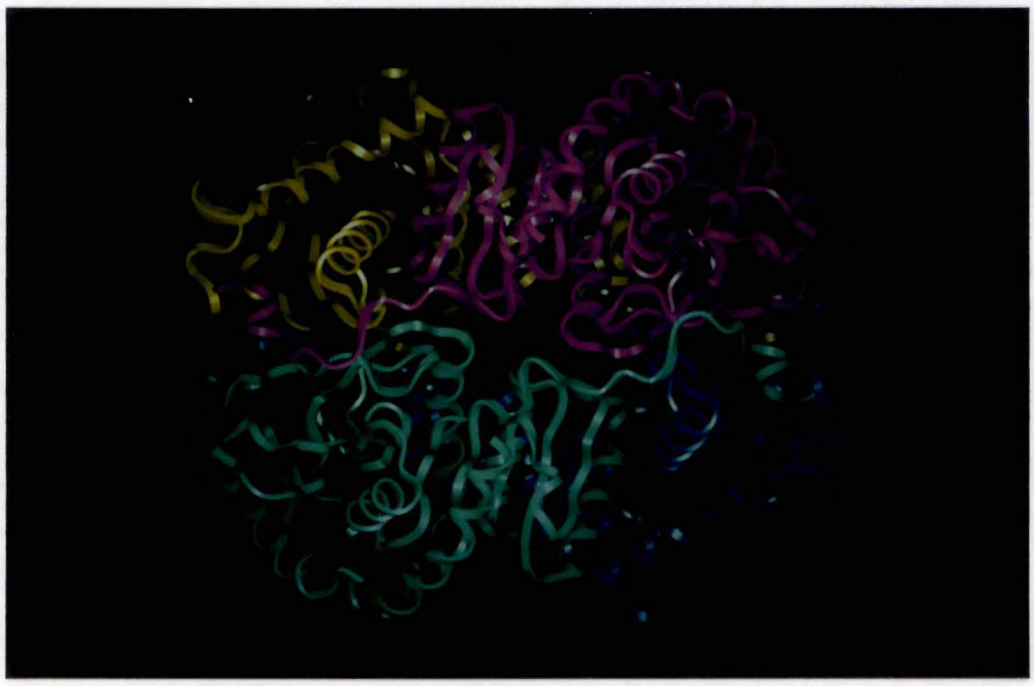
Le site actif est localisé à l'intersection des deux domaines A et B avec le NADH ancré d'un côté du site actif par ses interactions avec le domaine A (fig. 5.7). Le substrat interagit avec les résidus du domaine B de l'autre côté du site actif. L'une des raisons de l'arrangement structural complexe du domaine catalytique est de fournir une armature pour le positionnement correct de ses résidus, de telle sorte que le substrat soit correctement orienté par rapport au nicotinamide (Bränden, 1980).

5.4.2.Les changements conformationnels

Le site actif de la L-LDH doit être facilement accessible au solvant pour permettre la liaison du coenzyme. De plus, le site doit rester accessible après la fixation du coenzyme, afin de permettre la fixation du substrat.

Cependant, lors de la réaction catalytique, l'environnement interne du site actif ne doit plus contenir de molécules d'eau. Ceci est réalisé par une combinaison de la liaison du coenzyme et du substrat et d'un changement conformationnel de l'enzyme qui ferme le site actif.

Ce changement conformationnel consiste principalement en un large mouvement de la boucle 102 à 109 qui ferme le site actif de la L-LDH sous forme du complexe ternaire (White et al., 1978). En plus, d'autres éléments structurels, contribuant à la fermeture du site actif, bougent à plus petite échelle (Gerstein et Chothia, 1991). Les facteurs induisant



Modèle 3D d'un tétramère de L-LDH de muscle de lapin

Figure 6.1

ces changements semblent être le pyrophosphate du NADH et la liaison du pyruvate mais les mécanismes d'induction de ce changement ne sont que partiellement connus.

6.La tétramérisation

Tenenbraun-Bayer et Levitzki (1976) étudient les mécanismes de tétramérisation de la L-LDH de muscle de porc (figure 6.1). Ils distinguent 4 étapes (figure 6.2).

Monomère dénaturé <-1-> monomère partiellement replié <-2-> monomère replié <-3-> dimère <-4-> tétramère

Fig. 6.2

A chacune de ces étapes correspondent des constantes d'équilibre. Les étapes 1 et 2 sont lentes mais le repliement du monomère (étape 2) est favorisé par la présence de NAD^+ et de pyruvate. Ces deux substrats empêchent la dénaturation due au sodium dodécyl sulfate (SDS) et ont un effet d'accélération du taux de renaturation. La phase 3, le passage du monomère au dimère, est rapide et spontanée. Par contre, la phase 4, bien que rapide, nécessiterait certaines conditions comme la présence d'une concentration élevée en dimère, la présence de $SO_3^=$ (Tenenbayer et al., 1976).
L'état de trimère est occasionnel et n'est en tout cas pas une étape obligatoire du passage du dimère au tétramère.

7.Comparaison entre D-LDH et L-LDH

Comme nous l'avons vu précédemment, on trouve des D-LDH dans des espèces très éloignées au niveau évolutif. En effet, aussi bien *Lactobacillus bulgaricus*, *E. coli* que le crabe *Eriocher sinensis* sont capables de catalyser la transformation du pyruvate en D-lactate. L'homologie élevée rencontrée parmi les L-LDH, 35 % d'identité entre la L-LDH de muscle de roussette et de *Bacillus stearothermophilus*, est-elle de mise pour ces D-LDH, et ces deux groupes d'enzymes ont-ils une séquence et une structure proches?

Les séquences de D-LDH de *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus plantarum* montrent un similarité importante. Après avoir séquencé la L-LDH et la D-LDH de *Lactobacillus plantarum*, Ohta et Taguchi (91) n'ont trouvé aucune homologie significative (>10 % d'identité) entre ces 2 enzymes. Par ailleurs, le taux d'identité entre les séquences de D-LDH de *Lactobacillus plantarum* et de D-hydroxyisocaproate déshydrogénase de *Lactobacillus casei* est de 43 %.

Les D-LDH de *L. plantarum* et *L. bulgaricus* n'auraient donc pas de relation évolutive avec la famille des L-LDH (Lebras et Garel ,1991). Les D-LDH de *Lactobacillus* font en fait partie de la famille des 2-D-hydroxy acide déshydrogénases (2-D-OHDH) (Hottinger et al., 1992) comprenant entre autre la D-2-hydroxyisocaproate déshydrogénase de *L. casei* (Lerch et al., 1989), la glycérate déshydrogénase de concombre (Greenler et al., 1989), la D-3-phosphoglycérate déshydrogénase (Tobey et Grant, 1986) et la 4-phosphate déshydrogénase de *E. coli* (Schoenlein et al., 1986). Les taux d'identité de la D-LDH avec ces séquences est respectivement de 38 %, 24 %, 24 % et 22 %. Les principaux arguments permettant de constituer la famille des D-2-OHDH sont un taux de similarité significatif entre les séquences de cette famille, la production du même stéréoisomère par les différentes protéines de cette famille et la conservation de résidus jouant un rôle important dans ces protéines.

D'autre part, Papadopoulos et ses collaborateurs (1989) ont caractérisé biochimiquement les D-LDH de pied et d'hépatopancréas de *Patella caerulea*. Ces enzymes

sont actives sous forme tétramérique. De plus, les propriétés cinétiques des D-LDH de pied et d'hépatopancréas de *P. caerulea* sont respectivement semblables aux propriétés des L-LDH de muscle et de coeur des mammifères. Il n'est donc pas impossible que certaines D-LDH soient plus proches de la famille des L-2-OHDH que de la famille des D-2-OHDH.

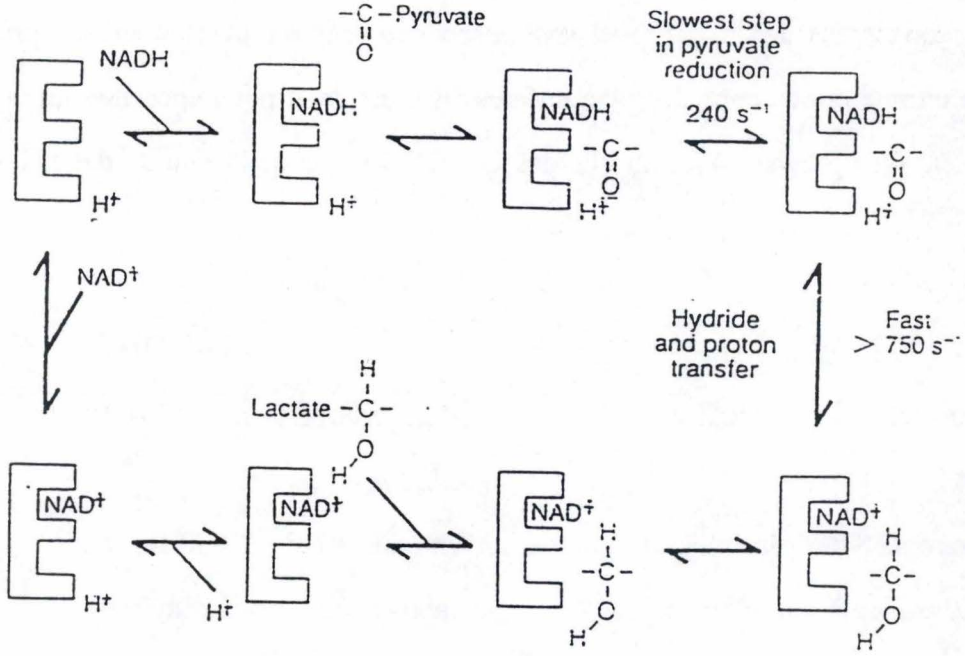
L-LDH de muscle de roussette	D-LDH de *Lactobacillus plantarum*
.329 AA	.322 AA
.monomère de 34000 Daltons	.monomère de 37000 Daltons
.active sous forme tétramérique	.active sous forme dimérique
.stéréoisomérie L	.stéréoisomérie D
.famille des L-2-OHDH	.famille des D-2-OHDH
.structure α/β	.structure α/β
.pattern glycine (GXGXXG) 28-33	.pattern glycine 152-157
.paire His195/Asp168 (rôle capital dans le site actif)	.2 candidats (couple His/Asp) possibles pour cette paire
.spécificité de substrat restreinte	.spécificité de substrat large

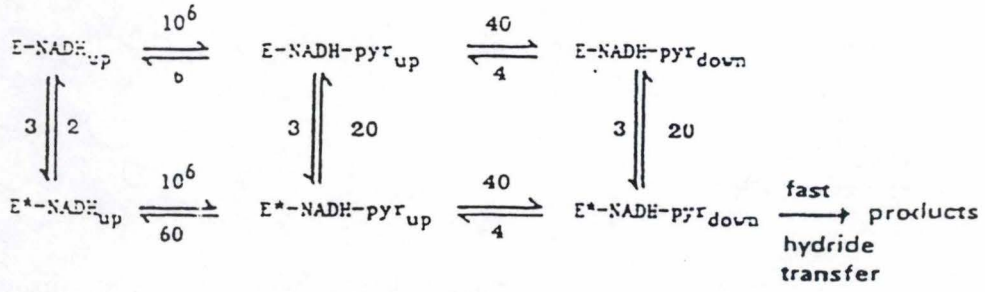
8.Le mécanisme catalytique

La réaction générale catalysée par la plupart des déshydrogénases est résumée par la figure 8.1.

$$S_{ox} + NADH + H^+ \quad <===> \quad S_{red} + NAD^+$$

fig. 8.1





Shémasreprésentant l'ordre d'arrivée et de départ du substrat et du coenzyme

Figure 8.3

où S_{ox} et S_{red} représentent, respectivement, les formes oxydée et réduite du substrat. Pour la L-LDH, le substrat oxydé est le pyruvate tandis que la forme réduite du substrat représente le L-lactate.

Selon la nomenclature de Cleland (1977), la L-LDH suit une cinétique de type ordonné Bi-Bi. L'ordre d'arrivée et de départ du coenzyme (NADH) et du substrat (pyruvate) est représenté, sur les figures 8.2 et 8.3, de manière schématique (Holbrook et al., 1978).

$$E <--> E.NADH <--> E.NADH.PYR <--> E.NAD^+.LAC <--> E.NAD^+ <--> E$$

fig. 8.2

Sept résidus principaux constituent le site actif. Il s'agit de la Thr246, la Gln102, l'Arg109, l'His195, l'Asp168, l'Arg171 et l'Ile250. Ils sont représentés sur les figures 8.4 et 8.5 (Clarke et al., 1985).

8.1.Le couple His/Asp

Le couplage d'un acide aspartique avec une histidine au niveau du site actif se retrouve dans différentes catégories d'enzymes: la chymotrypsine (Blow et al., 1968), la phospholipase A2 (Dijkstra et al., 1981), les malate/lactate déshydrogénases (Birktoft et Banaszak, 1983), ...

Il est suggéré que l'Asp contribue à l'efficience catalytique en augmentant le pK de l'His jusqu'à sa neutralité (Sperling et al., 1973) et en orientant l'His de manière à favoriser la catalyse acide/base (Stamato et al., 1986).

Chez les L-LDH, l'His195 du site actif agit comme un catalyseur acide/base (tour à tour accepteur et donneur de H^+). L'His195 est sous forme protonée dans le complexe enzyme/NADH/pyruvate et sous forme neutre dans le complexe enzyme/NAD^+/lactate.

L'His195 prend un proton à l'acide aspartique qui est alors chargé négativement. Lors de la formation du complexe ternaire, l'His195 va transférer un proton au carbonyl du pyruvate.

L'His devient alors neutre. Pour recommencer le cycle catalytique, il faudra que l'Asp reprenne un proton dans le solvant et retrouve ainsi sa forme acide (Clarke et al, 1988).

8.2.Le NADH

Le NADH transfère un ion hydrure au pyruvate dans le complexe ternaire. Ce transfert est totalement stéréospécifique, le taux de transfert non stéréospécifique étant de 1 pour 10^7 (LaReau et Anderson, 1989). Le transfert d'ion hydrure du NADH se passe au même moment que celui du proton par l'histidine 195, ce double transfert menant à la formation du L-lactate.

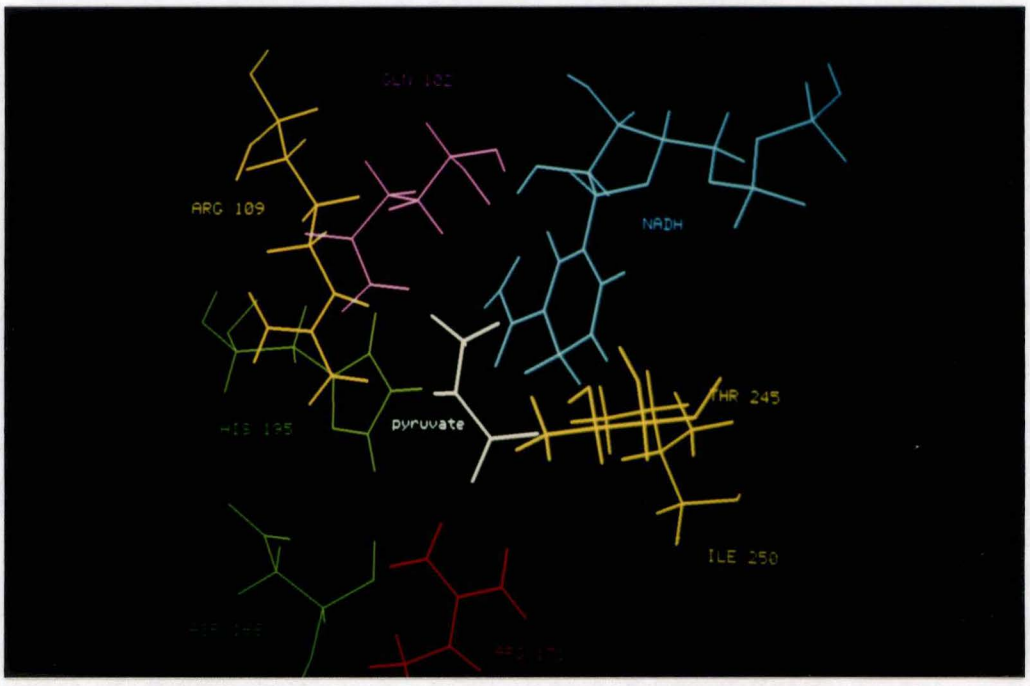
9.Les principaux inhibiteurs de L-LDH

Toutes les L-LDH isolées sont inhibées par le **pyruvate** (Holbrook et al.,1975) mais l'effet est plus prononcé avec l'isozyme de coeur que l'isozyme de muscle. La concentration en pyruvate requise pour l'inhibition est moindre à pH acide. D'après Coulson et Rabin (1969), c'est l'énolpyruvate qui est l'inhibiteur effectif, et ils suggèrent que celui-ci forme un complexe stable avec l'enzyme et le NAD^+. La concentration inhibitrice de pyruvate dépend au moins du pH et du type d'isozyme. Pour la L-LDH de muscle de lapin, une concentration de pyruvate de 50 mM (pH 7,0) est inhibitrice (Chenault et Whitesides, 1988).

La L-LDH est aussi inhibée par des fortes concentrations en **L-lactate**. L'inhibition serait le résultat de la formation du complexe ternaire enzyme, NADH et L-lactate.

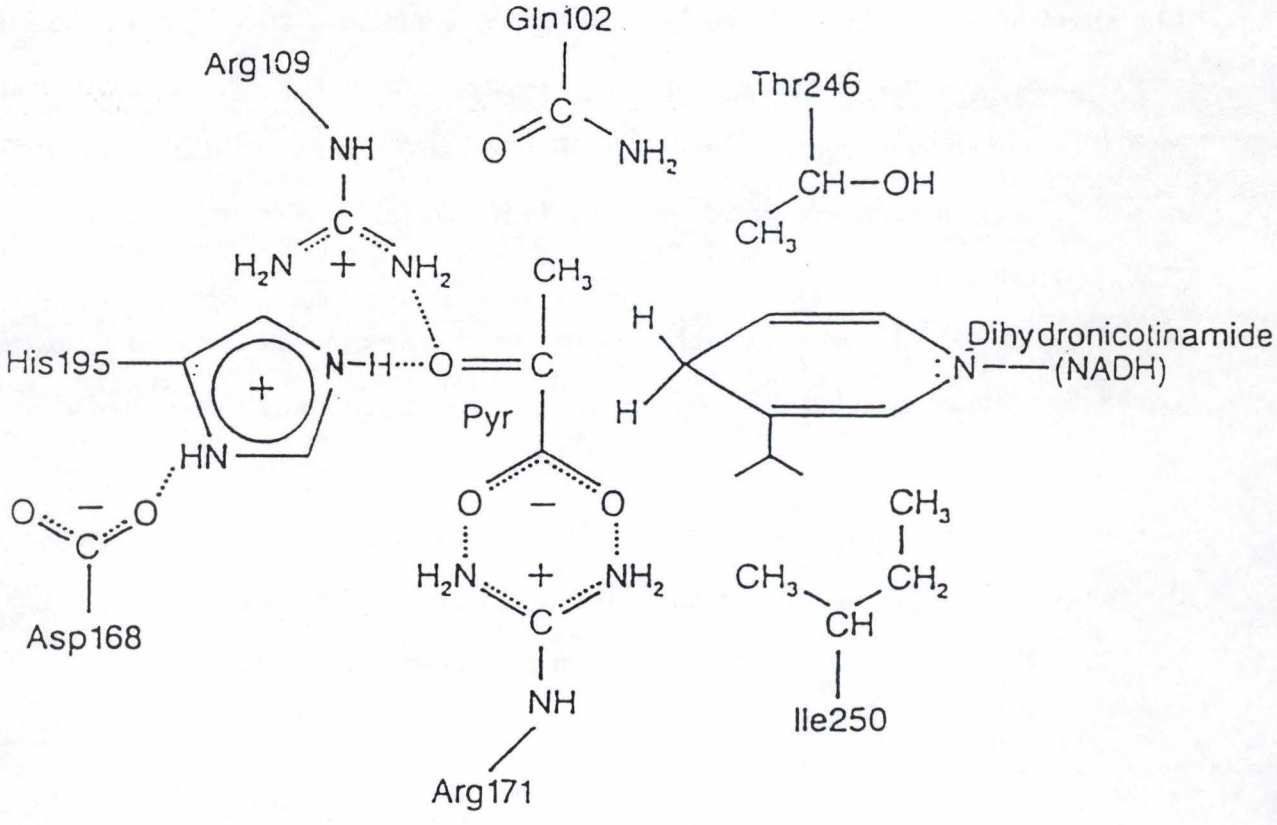
Le **coenzyme**, sous forme réduite ou oxydée, est aussi responsable de l'inhibition de l'enzyme mais uniquement lorsque sa concentration devient très importante.

Il existe également d'autres inhibiteurs, l'oxamate par exemple.



Modèle 3D du site actif de la L-LDH de muscle de lapin

Figure 10.1



Shéma du site actif de la L-LDH

Figure 10.2

10.Les mutations réalisées sur des L-LDH et leurs principaux effets

C'est principalement la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* qui a été la cible de nombreuses expériences de mutagenèse dirigée, pour mieux connaître son mécanisme catalytique et le rôle des différents AA présents dans le site actif (figures 10.1 et 10.2).

THR246: Ce résidu est conservé dans toutes les séquences connues. La thréonine est un AA hydrophile avec un groupement (hydroxyméthyl) qui stabiliserait le complexe ternaire par un pont hydrogène avec le groupe méthyl du pyruvate. Elle a été remplaçée par une glycine, ce qui a eu pour effet une réduction de l'ordre de 3000 de l'activité de l'enzyme (Jones et al., 1989). Cependant, ce mutant montre une préférence pour les α-céto acides avec une large chaîne hydrophobe ou hydrophile tels que l'oxaloacétate. La perte d'un pont hydrogène avec le substrat ou la rentrée d'eau dans le site actif seraient responsables de cette activité réduite, une chaîne latérale plus longue restituerait le pont hydrogène.

GLN102: Elle est conservée dans toutes les L-LDH sauf dans celles de testicules de rat et de souris, où elle est remplacée par une méthionine (surface accessible de 180 A^2) qui a approximativement les caractéristiques stériques de la glutamine (surface accessible de 185 A^2). Son rôle est semblable à celui de la Thr246. Elle a également été remplacée par une arginine dans la npL-LDH de *Bacillus stearothermophilus* (Jones et al., 1992), la charge positive de ce résidu convient pour former une liaison faible avec le groupe carboxyl du substrat. Une hypothèse séduisante serait que, dans le site actif du mutant, le pyruvate se place "à l'envers" (rotation de 180°) dans la poche du site actif ce qui impliquerait la formation de D-lactate. Cependant, aucune activité D-lactate n'est décelée avec le mutant (tableau 10.1). Le groupe carboxyl du pyruvate ne formerait donc pas de liaison avec l'Arg102. Le mutant a une efficience catalytique 10.000 fois supérieure au non mutant pour l'oxaloacétate, substrat dans lequel le groupe méthyl est suivi d'un groupe carboxyl.

Tableau 10.1

Pyruvate	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	0,04	188	$4,8\ 10^6$
Gln102Arg	1,2	2,45	$2\ 10^3$

Oxaloacétate	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	1,5	6	$4\ 10^3$
Gln102Arg	0,019	205	$1,1\ 10^7$

Tableau 10.2

Pyruvate	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	0,04	188	$4,7\ 10^6$
Gln102Asn	0,23	123	$5,35\ 10^5$

R=(CH2)3 CH3	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	0,35	32	$9,14\ 10^4$
Gln102Asn	6,27	39	$1,44\ 10^5$

L'intéraction de ce carboxyl (absent chez le pyruvate) avec la charge positive de l'arginine 102 serait responsable de l'efficience catalytique élevée du mutant.

Cette glutamine a également été remplacée par une asparagine de plus faible volume (Jones et al., 1989) afin d'augmenter le volume du site actif, ce qui permettrait à la LDH de catalyser la transformation de substrats plus grands que le pyruvate. L'efficience catalytique de ce mutant pour le pyruvate est environ 10 fois moindre par rapport au non mutant (tableau 10.2). Cependant, pour les substrats avec une plus grande chaîne aliphatique, le Kcat augmente et la constante d'affinité (Km) diminue pour le mutant.

ARG109: La mutation de l'arginine 109 en une glutamine (Clarke et al., 1989) a permis d'investiguer le rôle de cette Arg dans le site actif. L'affinité du mutant pour le pyruvate est diminuée, par contre celle du même mutant pour le NADH reste inchangée. La charge positive de l'arginine 109 stabiliserait le carbonyl du substrat. L'énergie libre locale (site actif) du complexe ternaire serait ainsi réduite.

ASP168: Ce résidu est conservé dans toutes les séquences de L-LDH connues. L'Asp168 se trouve à moins de 0,5 nm de l'histidine 195; deux mutations de cet acide aspartique ont été réalisées afin d'étudier son rôle dans le cycle catalytique. La mutation Asp168Ala (Clarke et al., 1989) empêche la formation d'un pont hydrogène entre l'His195 et l'Ala168, tandis que la mutation Asp168Asn (Clarke et al., 1989) maintient le pont hydrogène, mais supprime la possibilité d'avoir une charge positive portée normalement par l'acide aspartique. Les 2 mutations provoquent une diminution du Km pour le pyruvate, mais pas pour le lactate. Pour transférer un proton au pyruvate, l'His195 doit être protonée, et cette charge positive est stabilisée par l'Asp168. Les propriétés des deux mutants sont similaires, ce qui montre que c'est la charge négative de l'Asp168 qui est importante.

Tableau 10.3

Pyruvate	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km(M^{-1} s^{-1})
Non mutant	0,04	188	$4,8\ 10^6$
Arg171Tyr	58	64	$1,1\ 10^3$
Arg171Trp	51	23	$4,5\ 10^2$
Arg171Lys	125	18	$1,2\ 10^2$

ARG171: Ce résidu est conservé dans toutes les séquences de L-LDH connues. L'arginine aurait un rôle important dans l'orientation adéquate du pyruvate dans le site actif en fixant par des ponts hydrogènes son carboxyle (Jones et al., 1989). Jones et ses collaborateurs (1989) ont muté l'Arg171 en Tyr et Trp, AA hydrophobes, non chargés et assurant un encombrement stérique similaire à l'arginine. Les mutants conservent une certaine efficience catalytique avec les α-céto acides. Malgré cela, le Kcat/Km, mesurant l'efficience catalytique, est 1000 fois plus faible que celui de la protéine native (tableau 10.3). Mais l'activité de ces mutants est supérieure à celle du mutant Arg171Lys (Hart 87), bien que la lysine soit, comme l'arginine, un résidu chargé positivement. La délocalisation de la charge de l'Arg171 serait donc responsable de son rôle dans le site actif. De plus, la stéréospécificité de la L-LDH reste inaffectée par la perte de l'Arg171.

ILE250: Elle est conservée dans toutes les séquences de L-LDH connues sauf chez *Bacillus subtilis* où elle est remplacée par une Valine (caractéristiques semblables). Le remplacement de l'Ile250 par une Asn moins hydrophobe réduit fortement l'efficience catalytique (Clarke et al.,1989). La diminution de l'affinité pour le substrat, de plus de 99 % par rapport au non mutant, serait la conséquence de l'environnement, moins hydrophobe, pour la chaîne aliphatique du substrat.

TYR106: Il est possible de remplacer une tyrosine par un tryptophane sans disrupter l'enzyme, ces deux résidus étant proches stériquement (Clarke et al., 1989). Le tryptophane peut alors agir comme une sonde optique (fluorescence), ce qui permet d'étudier des arrangements structurels fins de l'enzyme. Or, un des réarrangements structurels les plus importants est la fermeture de la boucle (résidus 102 à 109) sur le site actif. L'analyse de la fluorescence montre que le résidu Tyr106 est sur la face externe de l'enzyme avant l'arrivée du substrat et se retrouve dans une position plus interne dans le complexe ternaire. Cette fermeture a pour conséquence le déplacement de l'Arg 109, responsable de la polarisation

du carbonyl du substrat, dans le site actif, et le déplacement de l'eau présente dans le site actif (discrimination entre les différentes chaînes des céto-acides).

ASP197: Cet acide aspartique a été muté en une asparagine (Clarke et al.,1989). Cette mutation avait pour but d'enlever une charge négative à proximité du site actif afin de changer la spécificité de la LDH (du pyruvate vers l'oxaloacétate). L'efficience catalytique pour le pyruvate est légèrement diminuée par rapport au non mutant. Mais le rapport des efficiences catalytiques entre le pyruvate et l'oxaloacétate n'est pas inversé.

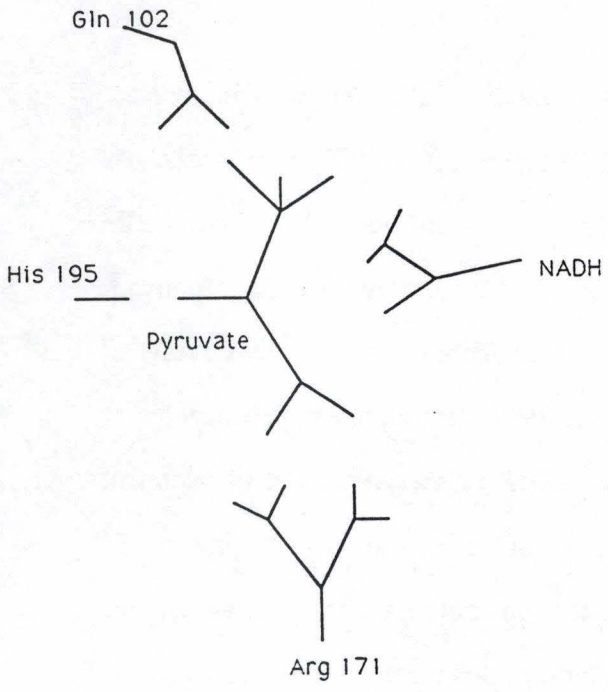
GLU107: L'acide glutamique est remplaçé par une glutamine (Clarke et al., 1989) dans le même but que la mutation Asp197Asn. L'efficience catalytique diminue, aussi, légèrement. Cependant, l'effet de l'élargissement de la spécificité est plus marqué pour la mutation Asp197Asn qui est située à l'intérieur de la protéine que pour la mutation Glu107Gln située à l'extérieur de cette protéine (où la constante diélectrique est plus élevée).

ARG173: Le FBP a-t-il un rôle direct sur l'arrangement du site actif, ou un effet indirect via la formation de tétramère? La mutation Arg173Gln (Clarke et al., 1989) n'empêche pas la fixation du FBP et n'a pas d'effet d'activation de la forme dimèrique. Par contre, elle bloque l'activation par le FBP de la tétramérisation, les 2 dimères mutants pouvant s'associer sans FBP (répulsion de charge diminuée) afin de former un tétramère stable et actif. L'Arg173 est conservée dans toutes les séquences de LDH connues (procaryotes et eucaryotes). Or, il n'y a pas d'activation FBP chez les LDH d'eucaryotes, qui parviennent tout de même à former des tétramères probablement grâce à un bras amino terminal de 14 résidus formant une courte hélice α qui permettrait un ancrage des deux dimères énergétiquement favorable malgré les charges positives en opposition. On peut conclure de ceci que la tétramérisation, quel que soit son mécanisme, engendre des modifications spatiales du site actif permettant le bon fonctionnement de l'enzyme.

Tableau 10.4

Pyruvate	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	0,06	250	$4,2\ 10^6$
Mutant	4	32	$8\ 10^3$

a-cétoisocaproate	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	6,7	0,33	50
Mutant	14,3	18,5	$1,3\ 10^3$



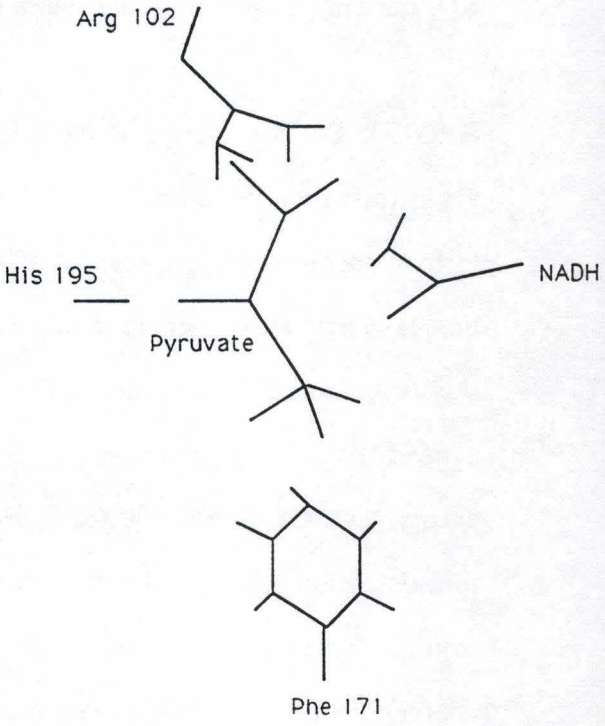


Figure 11

Site actif de la LDH non mutante

Site actif de la LDH Q102R/R171F

Shéma montrant l'hypothèse du retournement du substrat.

GLN102, LYS103, PRO104, ALA236 et ALA237: Ces cinq résidus ont été mutés respectivement en Met, Val, Ser, Gly et Gly (Clarke et al., 1990). Les caractéristiques cinétiques de ce quintuple mutant sont décrites dans le tableau 10.4. La modification de deux régions bordant le site actif a pour objet d'élargir la spécificité à des substrats avec une chaîne latérale hydrophobe plus large. Les cinq mutations ensemble provoquent une spécificité élargie avec une efficience catalytique 25 fois supérieure pour l'alpha-cétoisocaproate.

11. But du mémoire

Dans le cadre de l'étude des bases moléculaires de la stéréospécificité de la L-lactate déshydrogénase, nous allons remplacer le résidu glutamine 102 de la L-LDH de muscle de lapin en une arginine. Cette mutation devrait permettre, conjointement à une deuxième mutation au niveau de l'arginine 171, de tester l'hypothèse suivante. Dans la protéine double mutante, Q102R et R171F, le pyruvate pourrait s'orienter différemment dans la poche du site actif (figure 11). Cette nouvelle orientation, dans laquelle, le carboxyle du pyruvate intéragirait avec l'arginine 102, mènerait à la formation du D(-)lactate.

Matériel et méthodes

1.Matériel

1.1.Solutions

Solution de bromure d'éthidium:
2 mg/ml d'eau distillée.

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

Solution d'uridine:
- 125 mg/ml d'eau distillée.
  Conserver à -20°C.

Solutions d'antibiotiques (Boerhinger): conservées à - 20°c
- Ampicilline 10 % (w:v) dans de l'eau distillée.
  Stériliser par filtration sur filtre Millipore 0,22 μm.
- Chloramphénicol 33 mg/ml dans de l'éthanol.
- Tétracycline 12,5 mg/ml dans un mélange eau distillée/éthanol 1:1 (v:v).

Phénol saturé en TE:
- Phénol 50 ml
- Hydroxyquinoline 0,05 g

Saturer avec 50 ml de TE, laisser décanter, éliminer le TE et recommencer deux fois.
Ne pas éliminer le dernier volume de TE.
Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière.

RNase A (Boerhinger): 10 mg/ml d'eau distillée
Incuber 15 minutes à 100°C.
Conserver à - 20°C.

M9 10X:
- Na_2HPO_4 6 %
- KH_2PO_4 3 %
- NH_4Cl 1 %
- NaCl 0,5 %

Solution E (Test de Folin):
- NaOH 0,2 M 19,6 ml
- Na_2CO_3 4 % 19,6 ml
- $CuSO_4.5(H_2O)$ 5 % 0,4 ml
- Tartrate 2 % 0,4 ml

Solution SB 5X (Electrophorèse de protéines):
- TRIS.HCl 312,5 mM
- SDS 10 % (w:v)
- Bleu de bromophénol 0,005 % (w:v)
- Glycérol 50 % (v:v)
- β-mercaptoéthanol 25 % (w:v)

Solution de coloration au bleu de coomassie (Electrophorèse des protéines):
- Bleu de Coomassie 0,1 % (w:v)
- Acide acétique 10 % (v:v)
- Méthanol 40 % (v:v)

Solution de décoloration (Electrophorèse des protéines):
- Méthanol 40 % (v:v)
- Acide acétique 10 % (v:v)

Solution de fixation (Electrophorèse des protéines):
- Méthanol 30 % (v:v)
- Glycérol 3 % (v:v)

Solution révélatrice (Electrophorèse des protéines):
- Formaldéhyde 37 % 50 µl
- Na_2CO_3 3 % 100 ml

1.2.Tampons

TE:
- TRIS HCl 10 mM
- EDTA 1 mM

Amener à pH 8,0.

P1 (QIAGEN):
- TRIS.HCl 50 mM
- EDTA 10 mM

Amener à pH 8,0.

P2 (QIAGEN):
- NaOH 200 mM
- SDS 1%

P3 (QIAGEN):
- KAc 2,55 M

Amener à pH 4,8 avec de l'HAc.

QBT (QIAGEN):
- NaCl 750 mM
- MOPS (acide 3- (N- Morphinol)propane sulfonique) 50 mM
- Ethanol 15 %

Amener à pH 7,0 avec du NaOH.

QC (QIAGEN):
- NaCl 1 M
- MOPS 50 mM
- Ethanol 15 %

Amener à PH 7,0 avec du NaOH.

QF (QIAGEN):
- NaCl 1,25 M
- MOPS 50 mM
- Ethanol 15 %

Amener à pH 8,2 avec du NaOH.

HS:
- TRIS.HCL 100 mM
- NaCl 300 mM
- EDTA 1 mM

Amener à pH 8.

TBE 10X:
- TRIS.HCL 108 g
- Sel de Borate 55 g
- EDTA (pH 8,0) 9,3 g

Porter à 1 litre avec de l'eau distillée.

TAE 50X:
- TRIS.HCL 242 g
- HAc 57,1 ml
- EDTA 0,5 M (pH 8,0) 100 ml

Porter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Binding Buffer (BIO-RAD):
- TRIS.HCl 50 mM
- EDTA (pH 7,5) 1 mM
- NaClO4 6 M

Wash Buffer (BIO-RAD):
- TRIS.HCl 40 mM
- EDTA (pH 7,4) 4 mM
- NaCl 0,8 M

Ajouter 1 volume d'éthanol 95 %.

High Salt Buffer:
- TRIS.HCL (pH 7,5) 20 mM
- EDTA 1 mM
- NaCl 1,5 M

Tampon d'appariement de l'oligonucléotide (mutagenèse dirigée):
- TRIS.HCl (pH 7,75) 200 mM
- $MgCl_2$ 20 mM
- NaCl 500 mM

Tampon de synthèse (mutagenèse dirigée):
- TRIS.HCl (pH 7,75) 100 mM
- $MgCl_2$ 50 mM
- DTT 20 mM
- dNTP 5 mM (chacune des bases)
- ATP 10 mM

Tampon d'arrêt (mutagenèse dirigée):
- TRIS.HCL 10 mM
- EDTA 10 mM

Amener à pH8,0.

1.3. Milieux de culture pour bactéries

1.3.1. Milieux riches

LB (Luria-Bertani) liquide:
- Tryptone (Oxoïdd) 1 %
- Yeast Extract (Oxoïd) 0,5 %
- NaCl (Merck) 0,5 %

Autoclaver.

LB solide:
Ajouter 2 % d'agar au LB liquide.
Autoclaver.
Attendre que la température du milieu soit inférieure à 55°C avant d'ajouter des substances thermolabiles telles que les antibiotiques.

SOC:

- Tryptone	2 %
- Yeast extract	0,5 %
- NaCl	10 mM
- KCl	2,5 mM
- $MgCl_2$	10 mM
- $MgSO_4$	10 mM
- Glucose	20 mM

Autoclaver.

1.3.2. Milieu minimum

Milieu M9 solide:

- Solution M9	10 %
- $MgSO_4$ 1M	0,1 %
- $CaCl_2$	0,1 %
- Glucose 20 %	1 %
- Agar	2 %

Autoclaver.

1.3.3. Milieux solides pour phages

Hplate agar:

- Tryptone	1 %
- Yeast extract	0,8 %
- NaCl	1,5 %
- Agar	1,5 %

Autoclaver.

Htop agar:

- Tryptone	1 %
- Yeast extract	0,8 %
- NaCl	0,8 %
- Agar	0,8 %

Autoclaver.

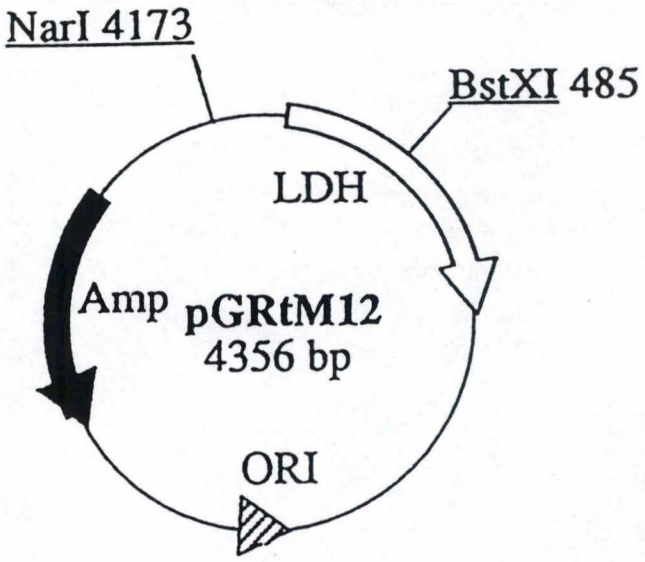


Figure 1

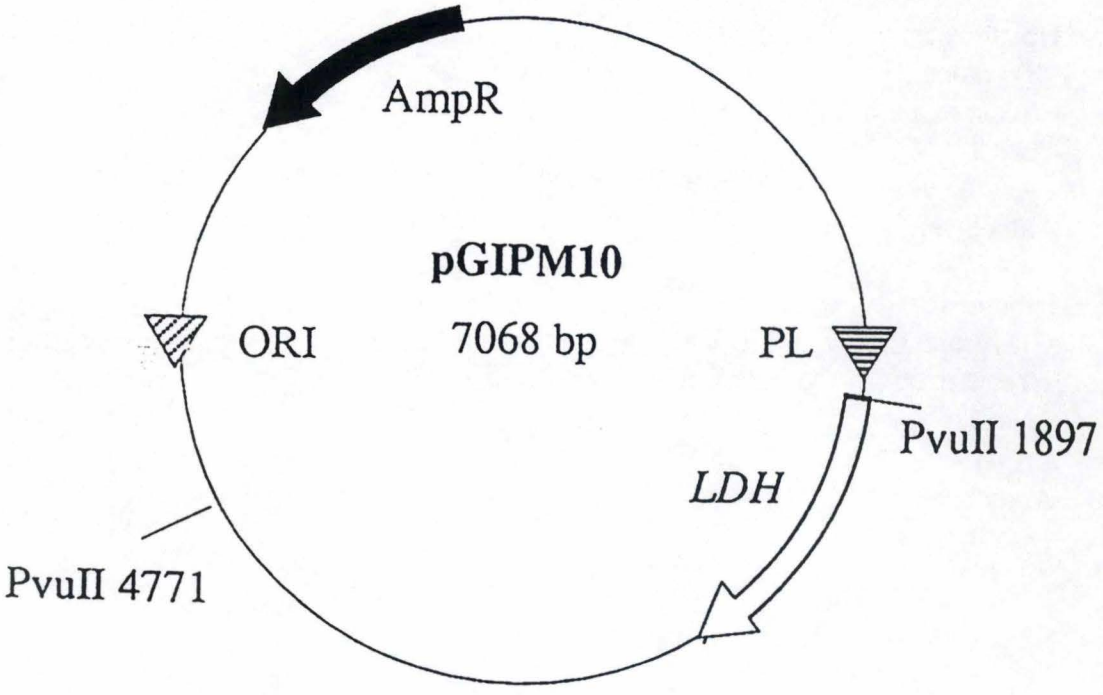


Figure 2

1.4.Souches de bactéries

Escherichia coli TG1

Génotype: supE, hsd, thi, Δ(lac⁻ proAB), F'[tra Δ36 proAB⁺ lacI^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.

E. coli CJ236

Génotype: dut⁻ , ung⁻ , thi⁻ , relA1/pCJ105(Cm^r).
Caractéristiques principales du phénotype: Le gène dut codant pour la déoxyuridinetriphosphatase (dUTPase) est muté. Cette mutation empêche la dégradation de l'uracile. La mutation dans le gène ung codant pour l'uracil-DNA-glycosilase empêche l'excision des uraciles incorporées dans l'ADN.

E. coli AR58

Génotype: galE::TN10, Tet^r, λcI857, gal⁻ , bio⁻ , uvrB⁻ .
Caractéristiques principales du phénotype: Le gène tet^r procure à la souche une résistance à la tétracycline. λcI857 est un répresseur thermosensible (inactivé à 42°C) du phage Lambda.

1.5.Plasmides

1.5.1.pGRtM12 (figure 1)

Le plasmide pGRtM12 correspond au plasmide pGEM3Z dans lequel la partie codante du gène de la LDH de muscle de lapin a été insérée. Il a une origine de réplication (ORI) Col E1 pour *E. coli*, et porte le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R). Il est à noter que ce plasmide ne possède pas de promoteur permettant la transcription de la LDH.

1.5.2.pOTSnco12

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 lambda.
Ce promoteur est réprimé par la présence du répresseur CI du phage lambda.
Ce plasmide est de type "medium copy".

1.5.3.pGIPM10 (figure 2)

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

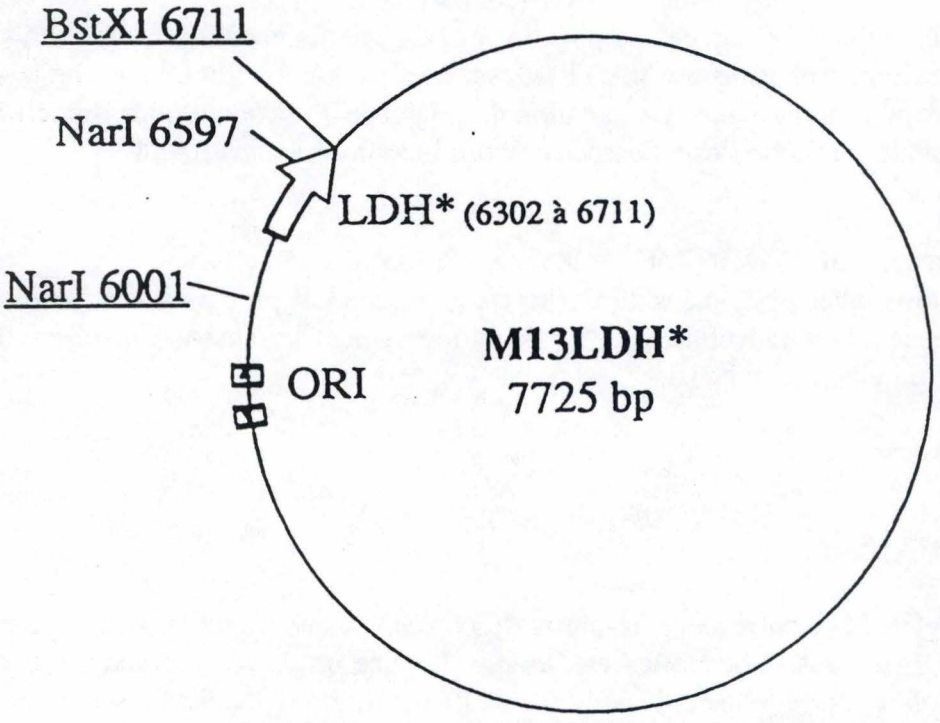

BstXI 6711
NarI 6597
LDH* (6302 à 6711)
NarI 6001
ORI
M13LDH*
7725 bp

Figure 3

1.6.Phages

1.6.1.M13mp18

L'ADN de ce phage contient 7250 pB. Il contient une origine de réplication (ORI) bidirectionnelle. Il contient un site de clonage multiple en position 6231-6282.

1.6.2.M13LDH (figure 3)

Le phage M13LDH (7725 pB) a été constuit par P. Mertens à partir de M13mp18. Il contient une origine de réplication (ORI) bidirectionnelle et le début de la séquence codante de la LDH de muscle de lapin (421 pb). Le codon initiateur de la traduction est placé en position 6302 et le codon de la glutamine 102 se trouve en position 6599.

2.Méthodes

2.1.Techniques relatives à l'ADN

2.1.1.Préparation de vecteurs d'ADN

2.1.1.1.Minipréparation d'ADN plasmidique

Ce protocole permet d'obtenir une quantité d'ADN double brin suffisante pour être diagnostiquée par restriction.

- Effectuer une préculture à 37°C (TG1) ou à 32°C (AR58) dans 5 ml de LB (avec antibiotiques si nécessaire) avec agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de culture 5 minutes à 13000 g.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 0,3 ml de tampon P1.
- Ajouter 0,3 ml du tampon P2, mélanger légèrement et laisser reposer 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 0,3 ml du tampon P3, mélanger doucement et centrifuger 20 minutes à 13000 g.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter 0,72 ml d'isopropanol et bien agiter.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 g et éliminer le surnageant.
- Ajouter 0,72 ml d'éthanol 70 %, centrifuger 5 minutes à 13000 g et éliminer le surnageant.
- Sécher le culot.
- Resuspendre dans 15 μl d'eau et y ajouter 2 μl de RNAseA (1mg/ml de P1).

2.1.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique.

Ce protocole permet d'obtenir une quantité importante d'ADN double brin constituant une solution stock conservée à - 20°C. On peut utiliser cette solution pour transformer une souche par exemple.

- Effectuer une préculture de *E. coli* de 10 ml de LB (avec antibiotique(s)) à 37°C sous agitation.
- Mettre 2 ml de cette culture dans 100 ml de LB (avec antibiotique(s)) et incuber pendant 16 heures à 37°C sous agitation.
- Mettre la culture dans un tube et centrifuger 10 minutes à 4000g.
- Eliminer le surnageant et resuspendre à la pipette avec 4 ml de tampon P1 avec 100 μg de RNAaseA/ml.
- Transférer dans un tube de 30 ml.
- Ajouter 4 ml de P2, mélanger par retournement et laisser 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de P3 et mélanger par retournement.
- Centrifuger 30 minutes à 20000 g (4°C).
- Récupérer le surnageant et recommencer la centrifugation si le surnageant est trouble.
- Prééquilibrer une colonne QIAGEN Pack-100 avec 3 ml de QBT.
- Appliquer le surnageant.
- Laver avec 10 ml de QC.
- Eluer l'ADN plasmidique dans un corex de 15 ml avec 5 ml de QF.
- Précipiter avec 0,7 volume d'isopropanol et laisser 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 30 minutes à 13000 g.
- Eliminer le surnageant et laver le culot à l'éthanol 70 %.
- Rejeter l'alcool, laisser secher près d'une flamme et resuspendre dans de l'eau distillée + 5 % de tampon P1 avec 2 mg deRNAaseA/ml.

2.1.1.3. Minipréparation d'ADN de phage M13 double brin sous forme réplicative

- Effectuer une préculture de *E. coli* TG1 dans 5 ml de LB à 37°C sous agitation.
- Diluer 50 μl de cette préculture dans 5 ml de LB.
- Laisser 1 heure à 37°C en agitant.
- Ajouter une plage de lyse sur H Plate Agar prise au cure-dent stérile.
- Incuber 5 heures à 37°C sous agitation vigoureuse.
- Pour la suite, on procède comme pour une minipréparation de plasmide (point 2.1.1).

2.1.1.4. Midipréparation d'ADN de phage M13 double brin sous forme réplicative

- Effectuer une préculture de *E. coli* TG1 dans 5 ml de LB sous agitation.
- Placer 5 ml de LB dans un tube Corex de 15 ml et ajouter 100 μl de préculture.
- Incuber 1 heure à 37°C sous agitation.
- Ajouter une plage de lyse de phage M13 à l'aide d'un cure-dent stérile.
- Incuber 5 heures à 37°C sous agitation vigoureuse.

- Centrifuger 5 minutes à 13000g.
- Prélever le surnageant (conserver éventuellement à 4°C).
- Effectuer une préculture dans 10 ml de LB à partir d'une colonie de *E. coli* TG1 à 37°C.
- Prendre 1 ml de cette préculture et diluer dans 100 ml de LB.
- Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une DO à 550 nm de 0,3.
- Ajouter à cette culture 1 ml du surnageant obtenu précédemment.
- Incuber 5 heures à 37°C sous agitation vigoureuse.
- Transférer dans un tube à centrifuger.
- Centrifuger 30 minutes à 5000g (4°C).
- Eliminer le surnageant (conserver éventuellement pour préparation de simple brin à 4°C) et conserver le culot à - 20°C.
- Procéder comme la midipréparation de plasmide (point 2.1.2).

2.1.1.5.Maxipréparation d'ADN de phage M13 simple brin

Procéder comme pour la midi-préparation de M13 double brin (point 2.1.4), mis à part que l'on récupère le surnageant, sans prélever de cellules.

- Ajouter 0,2 volume de solution PEG 20 % NaCl 2,5 M au surnageant.
- Mélanger et laisser 45 minutes à 4°C.
- Centrifuger 20 minutes à 5000 g et éliminer le surnageant.
- Centrifuger 5 minutes et éliminer le reste du surnageant.
- Resuspendre le culot avec 1 ml de TE et transférer dans un Corex.
- Ajouter 1 ml de PEG 20 % NaCl 2,5 M.
- Mélanger et laisser 15 minutes à 4°C.
- Centrifuger 5 minutes et éliminer le surnageant.
- Recentrifuger et éliminer toutes traces de PEG/NaCl.
- Resuspendre dans 500 µl de TE.
- Extraire les protéines au phénol.
- Conserver à -20°C.

2.1.1.6.Maxipréparation de simple brin uracilé

- Lancer une préculture de *E. coli* CJ236 dans 10 ml de LB additionné de 10 µl de solution de chloramphénicol à 33 mg/ml.
- A l'aide d'une pipette pasteur stérile, transférer une plaque de M13 dans un eppendorf contenant 200 µl de TE, incuber à 60°C pendant 5 minutes.
- Agiter au Vortex vigoureusement pendant 30 secondes pour décrocher le phage de l'agar.
- Centrifuger pendant 2 minutes à 13000 g et récupérer le surnageant.
- Dans un Erlenmeyer contenant 20 ml de milieu LB, 20 µl de chloramphénicol à 33 mg/ml et 40 µl d'une solution d'uridine à 125 mg/ml, ajouter 1 ml de la préculture *E. coli* CJ236.
- Incuber en agitant à 37°C pendant 45 minutes, puis infecter en ajoutant les 200 µl de la solution du phage M13.
- Agiter à 37°C pendant 6 heures.
- Centrifuger 20 minutes à 27000 g.

- Récupérer le surnagent, stériliser par filtration (filtre de 0,22 μm) et transférer le surnageant dans un tube en polypropylène.
- Ajouter 40 μl de RNAseA 10 mg/ml et 5 ml de PEG 20 % NaCl 2,5 M.
- Mélanger et incuber une nuit à 4°C.
- Centrifuger 20 minutes à 27000 g.
- Eliminer le surnageant, resuspendre dans 200 μl de tampon HS et transférer dans un Eppendorf.
- Rincer les parois du tube avec 100 μl du tampon HS et les ajouter à l'Eppendorf.
- Agiter 30 secondes au Vortex et laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 g et récupérer le surnageant.
- Extraire les protéines au phénol.
- Précipiter l'ADN à l'acétate d'ammonium.
- Ensemencer une préculture de 10 ml (avec 10 μl de chaque antibiotique(s)) avec *E. coli* et incuber à 37°C.

2.1.1.7.Extraction au phénol

- Porter le volume de la solution de plasmide ou de phage à 100 μl au minimum..
- Ajouter un volume de phénol saturé.
- Agiter 30 secondes au Vortex.
- Centrifuger 1 minute à 13000 g.
- Transférer la phase aqueuse dans un Eppendorf stérile.
- Ajouter un volume de tampon TE à l'Eppendorf centrifugé.
- Agiter 30 secondes au Vortex.
- Centrifuger 1 minute à 13000 g.
- Transférer dans le même Eppendorf stérile que précédemment.
- Ajouter à ce nouvel Eppendorf un volume de phénol saturé.
- Agiter 30 secondes au Vortex.
- Centrifuger 1 minute à 13000 g.
- Transférer la phase supérieure obtenue dans un troisième Eppendorf.
- Ajouter 500 μl d'éther saturé en eau.
- Agiter 30 secondes au Vortex.
- Centrifuger 1 minute à 13000 g.
- Eliminer la phase supérieure.
- Recommencer 2 fois l'opération à l'éther saturé.
- Déterminer le volume restant et laisser évaporer le reste d'éther sur table.
- Précipiter l'ADN.

2.1.1.8. Précipitation d'ADN

Méthode à l'acétate de sodium
- Ajouter 0,1 volume de NaAc 3M, pH5,2.
- Mélanger.
- Ajouter 2,5 volumes d'éthanol absolu stocké à - 20°C.
- Mélanger.
- Précipiter l'ADN 30 minutes sur glace.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 g.
- Eliminer le surnageant.
- Laisser sécher 10 minutes.
- Resuspendre avec de l'eau ou du TE + RNAseA (200 μg/ml).

Méthode au l'acétate d'ammonium
- Ajouter 0,1 volume d'AmAc 7,8 M.
- Ajouter 2,5 volumes d'éthanol absolu stocké à -20°C.
- Mélanger.
- Laisser 1 heure sur glace.
- Centrifuger 15 minutes.
- Eliminer le surnageant.
- Laver le culot à l'éthanol 90 % et le sécher.
- Resuspendre avec un volume adéquat de TE.

2.1.1.9. Electrophorèse d'ADN

Cette méthode de séparation de fragments d'ADN permet d'estimer leur taille et leur quantité. L'ADN, chargé négativement (groupements $PO_4^=$), va migrer vers l'électrode positive. Sa migration sera d'autant plus ralentie que son poids moléculaire sera élevé. L'ADN plasmidique peut prendre 3 formes: superenroulée (Completely Closed Circular, CCC), circulaire avec un lien phosphodiester clivé (Open Circular, OC) et linéaire (Linear, L). Ces 3 formes migrent de manière différente.

- Préparation de l'échantillon

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

- Préparation du gel

- Faire chauffer à ébullition 50 ml de TAE 1X + agarose (0,8 % à 2% selon la taille des fragments à séparer).
- Couler le gel lorsqu'il est transparent.
- Placer les peignes dans le gel.
- Ajouter de 5 à 10 μl de bromure d'éthidium 2 mg/ml.
- Laisser refroidir 20 minutes.
- Remplir la cuve et recouvrir le gel de TAE 1X.

Profil de restriction du phage λ par l'enzyme *Hind* III avec la taille des fragments obtenus exprimée en paire de base (pb)

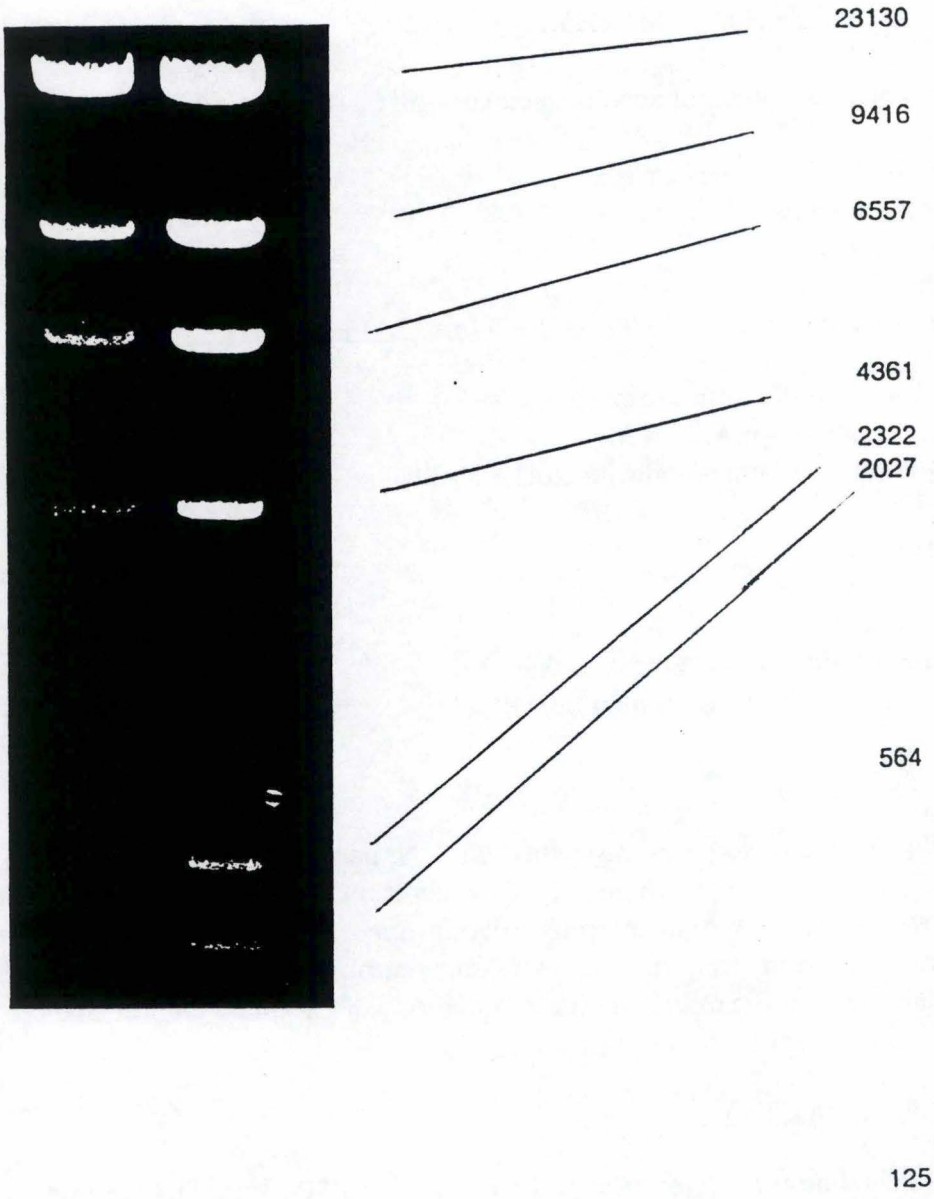


Figure 4

- Electrophorèse

- Effectuer les dépôts des échantillons préparés dans les puits (12 μl).
- Effectuer le dépôt du marqueur de taille: par exemple, le phage λ restreint par *Hind* III (noté λ/*Hind* III) (figure 4).
- Brancher le transformateur et appliquer une tension de 50 à 80 volts.
- Laisser migrer 30 minutes à 120 minutes.
- Révéler sur table UV et éventuellement photographier.

2.1.1.10.Restriction.

Les enzymes de restriction permettent de cliver l'ADN double brin de manière spécifique en un site donné (entre 4 et 11 paires de bases). L'électrophorèse d'ADN permet de diagnostiquer un plasmide ou un phage (double brin). On utilise aussi les enzymes de restriction pour obtenir des fragments d'ADN que l'on pourra éventuellement liguer à d'autres fragments. Certains enzymes de restriction hydrolysent les liens phosphodiesters de l'ADN en produisant des bouts francs, tandis que d'autres enzymes produisent des bouts collants.

- ADN à restreindre.
- Tampon de restriction 10X. Utiliser le tampon recommandé par la firme.
- Enzyme de restriction (1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 μg d'ADN de phage λ en 1 heure).
- Eau distillée afin d'obtenir le volume total.
- Incuber la mixture pendant 1 à 2 heures à la température indiquée par la firme (généralement 37°C).

2.1.1.11.Récupération de fragments d'ADN sur gel d'agarose

2.1.1.11.1.Méthode "Prep-A-Gene" (BIO-RAD)

- Après séparation des fragments d'ADN par électrophorèse, exciser la bande d'ADN à récupérer et placer le morceau d'agarose contenant l'ADN dans un Eppendorf.
- Centrifuger 3 minutes à 13000 g.
- Ajouter 3 volumes de Binding Buffer.
- Placer l'Eppendorf à 42°C pendant 5 à 10 minutes.
- Ajouter 5 μl de "Matrix" par 200 ng d'ADN à récupérer avec un maximum de 25 μl de "Matrix".
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 30 secondes à 13000 g.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot avec 50 volumes (par rapport au volume de "Matrix") de Binding Buffer (rinçage).
- Agiter 30 secondes au Vortex.
- Centrifuger 1 minute à 13000 g.
- Recommencer l'opération de rinçage.

- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot avec 50 volumes de Wash Buffer (par rapport au volume de "Matrix").
- Centrifuger 30 secondes à 13000 g et éliminer toute trace de liquide.
- Ajouter 1 volume de TE (par rapport au volume de "Matrix").
- Incuber 5 minutes à 42°C.
- Centrifuger 1 minute à 13000 g.
- Resuspendre dans du TE.

2.1.1.11.2.Méthode de Dretzen (1981)

- Préparer des morceaux de papier DEAE-cellulose de Whatman DE81 d'environ 1 cm^2.
- Tremper 3 heures dans une solution de NaCl 2,5 M.
- Laver 3 fois à l'eau stérile avant de les stocker dans une solution d'EDTA 1 mM à 4°C.
- Après séparation des fragments d'ADN par électrophorèse, pratiquer une incision dans le gel de part et d'autre de la bande à récupérer.
- Introduire dans l'incision entre la bande et le pôle positif le papier Whatman préalablement rincé dans du TBE.
- Poursuivre l'électrophorèse jusqu'à ce que l'ADN soit entré dans le papier.
- Prélever, rincer à l'eau distillée et sécher le papier Whatman.
- Mettre le papier dans un Eppendorf et ajouter 350 μl de High Salt Buffer.
- Incuber 2 heures à 37°C sous agitation.
- Percer le fond de l'Eppendorf (E1) avec une épingle chauffée et le placer dans un autre Eppendorf (E2).
- Centrifuger le tout 5 minutes à la microfuge.
- Centifuger l'Eppendorf E2 seul 5 minutes à 13000 g.
- Mettre le surnageant dans un autre Eppendorf et y ajouter 700 μl de butanol saturé en eau (extraction du bromure d'éthidium).
- Centrifuger 1 minute à 13000 g.
- Eliminer la phase supérieure.
- Précipiter l'ADN.

2.1.2.Ligation

La ligation permet d'assembler et de circulariser un ou plusieurs fragments d'ADN. La ligation de fragments coupés à bouts francs est toujours possible. Par contre, les molécules d'ADN coupées à bouts collants doivent être complémentaires.L'ADN ligase du phage T4 catalyse la formation de liens phosphodiesters entre des extrémités 5' phosphate et 3' hydroxyle d'une molécule d'ADN.

- Le vecteur linéarisé ou matrice, et le ou les fragment(s) à insérer ou insert(s) dans un rapport de concentration convenable, avec un optimum de 300 ng au total.
- Tampon de ligation 10X.
- 1 unité de ligase.
- Eau distillée afin d'obtenir le volume total.
- Incuber 16 heures à 16°C.

2.1.3. Transformation

2.1.3.1. Cellules compétentes au $CaCl_2$

- Effectuer une préculture de *E. coli* dans 10 ml de LB (+ 10 µl de chaque antibiotique) à 37°C.
- Transférer les 10 ml dans un Erlenmeyer de 1 litre contenant 400 ml de LB (+ 400 µl de chaque antibiotique).
- Incuber sous agitation à 37°C jusqu'à DO de 0,3 et placer 10 minutes dans la glace.
- Répartir la culture dans 4 tubes à centrifuger froids de 200 ml.
- Centrifuger 5 minutes à 4000 g à 4°C.
- Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 45 ml de $CaCl_2$ 50 mM froid.
- Laisser 20 minutes sur glace.
- Renouveler éventuellement l'opération au $CaCl_2$.
- Centrifuger dans les mêmes conditions et éliminer le surnageant.
- Resuspendre chaque culot avec 10 ml d'une solution froide de $CaCl_2$ 50 mM et glycérol 15 %.
- Réunir et aliquoter en 1 ml dans des Eppendorf froids.
- Stocker à - 80°C.

2.1.3.2. Transformation de *E. coli* par le phage M13

- Effectuer une préculture de *E. coli* TG1 dans 10 ml de LB à 37°C sous agitation.
- Diluer cette préculture 50 fois dans 10 ml du LB et incuber à 37°C jusqu'à DO à 550 nm de 0,3.
- Placer 300 µl de cellules compétentes (TG1) dans un tube en polypropylène maintenu dans la glace.
- Ajouter 10 ng d'ADN de phage M13 sous forme réplicative.
- Laisser le tout 40 minutes dans la glace.
- Placer 45 secondes dans un bain à 42°C.
- Laisser refroidir 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 200 µl de *E. coli* TG1 en phase exponentielle.
- Ajouter 3 ml de Htop agar à 45°C et verser rapidement sur une boîte de Pétri Hplate Agar préchauffé à 37°C pour éviter une solidification trop rapide.
- Incuber à 37°C pendant une nuit.

2.1.3.3. Transformation par un plasmide

- Placer 200 µl de cellules *E. coli* TG1 (ou AR58) compétentes dans un Eppendorf.
- Ajouter le plasmide (au moins 50 ng).
- Secouer légèrement.
- Laisser 40 minutes dans la glace.
- Incuber 2 minutes à 42°C en agitant légèrement dans un bain oscillant.
- Ajouter 0,5 ml de LB préchauffé à 37°C.
- Incuber 1 heure à 37°C sans agiter.

- Etaler entre 50 et 200 μl sur boîte de Pétri (LB/agarose + antibiotiques).
- Incuber une nuit à 37°C.

2.1.3.4. Cellules électrocompétentes (cellules glycérolées)

- Effectuer une préculture de *E. Coli* dans 10 ml de LB (avec antibiotique(s)) à 37°C sous agitation.
- Inoculer 1 litre de LB (+antibiotiques) avec 10 ml de préculture.
- Incuber à 37°C avec forte agitation jusqu'à une DO de 0,5 à 1.
- Laisser 20 minutes sur glace et centrifuger à 4°C à 4000 g pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 1 litre d'eau distillée stérile froide.
- Centrifuger à 4°C à 4000 g pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 0,5 litre d'eau distillée stérile froide.
- Centrifuger à 4°C à 4000 g pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10 % froid.
- Centrifuger à 4°C à 4000 g pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume final de 3 ml de glycérol 10 % froid et aliquoter par 100 μl.
- Conservation des cellules à - 80°C.

2.1.3.5. Electroporation

Nous utiliserons la technique de l'électroporation afin de transformer *E. coli* AR58 avec des plasmides. Contrairement à la méthode de transformation aux cellules compétentes au $CaCl_2$, l'électroporation consiste à faire rentrer de façon active l'ADN dans les cellules grâce à un courant continu de 2500 volts émis pendant un temps très court (+/- 5 secondes). Le courant provoquerait une dépolarisation de la membrane cellulaire, ce qui entraînerait la formation de pores dans la double couche lipidique. L'ADN pourrait entrer dans la cellule par ces pores d'autant plus facilement qu'il est chargé négativement. Le taux de transformation est supérieur de quatre ordres de grandeur par rapport à la méthode classique (cellules compétentes au $CaCl_2$).

- Dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Dans un Eppendorf froid, mélanger 100 μl de cellules avec 1 à 5 μl d'ADN.
- Bien mélanger et laisser 1 minute sur glace.
- Placer le "Gene Pulser" à 25 μF et 2500 volts et le "Gene Controller" à 200 Ω.
- Transférer la mixture d'ADN et de cellules dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm de largeur, mettre cette cuvette entre les 2 électrodes de l'électroporateur et fermer le circuit (jusqu'au bip sonore).
- Enlever la cuvette et y ajouter immédiatement 1 ml de SOC et resuspendre les cellules.
- Transférer la mixture dans un Eppendorf et incuber 1 heure à 37°C avec une légère agitation.
- Etaler sur milieu sélectif.

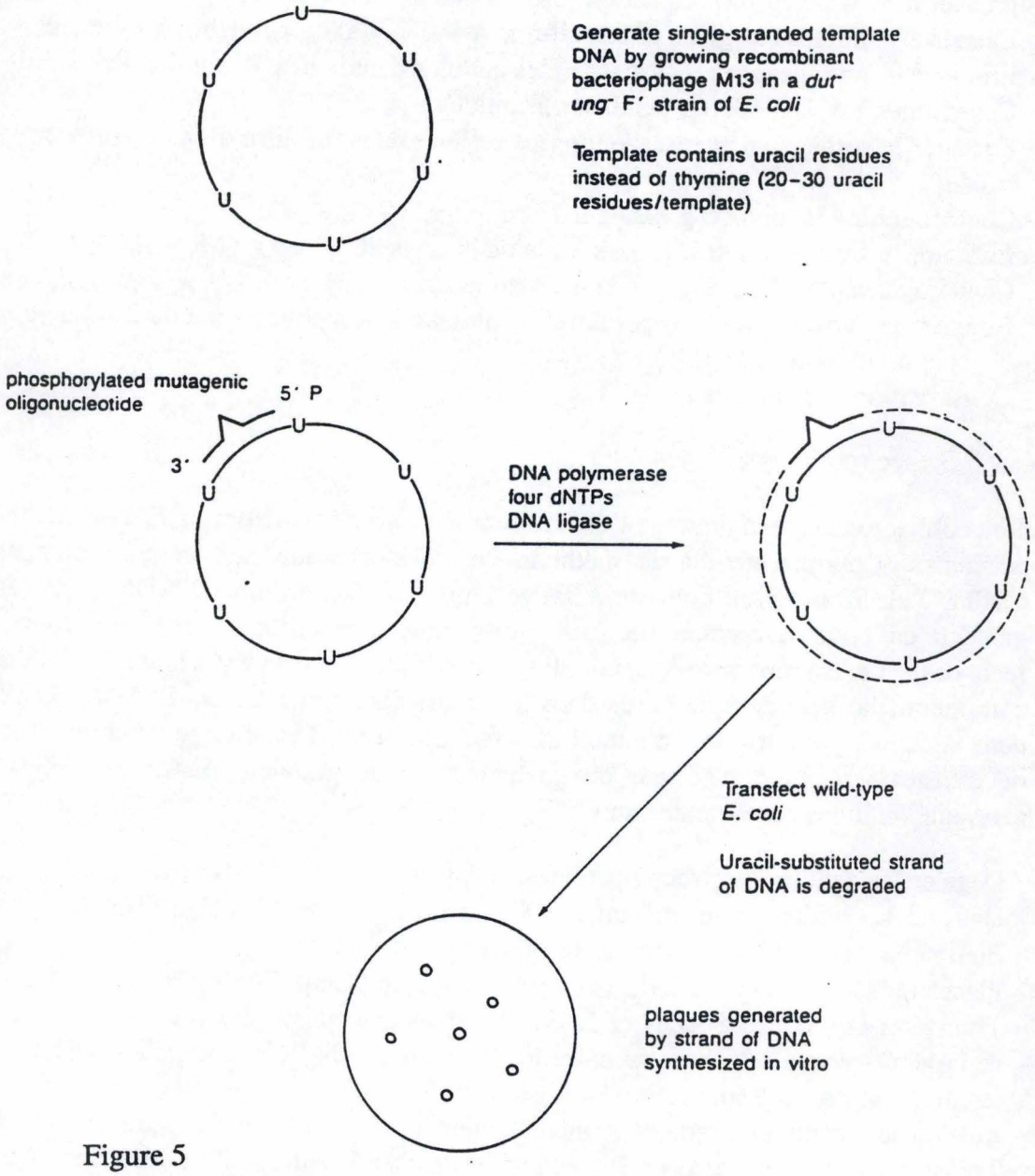


Figure 5

Oligonucleotide-mediated, site-directed mutagenesis using the Kunkel method (see text for details).

2.1.4. Mutagenèse dirigée: Méthode de Kunkel, 1985 (figure 5)

En présence d'uraciles, la souche de *E. coli* CJ236, incapable de dégrader l'UTP, incorpore des uraciles dans l'ADN, a raison de 20 ou 30 par plasmide (d'une taille de 6000 pB). L'appariement de l'oligonucléotide à ce brin uracilé va être le point de départ de la polymérisation *in vitro*, en présence de polymérase et des bases dATP,dCTP,dGTP et dTTP, d'un brin complémentaire non uracilé. Dans une souche normale (TG1), le brin uracilé va être dégradé. Il ne restera plus que le brin complémentaire non uracilé et mutant. Après avoir synthétisé le simple brin uracilé (point 1.6.), nous suivons le protocole décrit par Boehringer et dont voici les principales étapes.

Phosphoryler l'oligonucléotide

- Mettre dans un Eppendorf.

oligonucléotide	200 picomole (pmole)
Tris 1M pH8	3 μl
$MgCl_2$ 200 mM	1,5 μl
DTT 100 mM	1,5 μl
ATP 1 mM	13 μl
T4 kinase	4,5 U
H_2O	ajuster à 30 μl

- Incuber la mixture 45 minutes à 37°C et chauffer 10 minutes à 65°C pour inactiver la kinase.

Hybridation de l'oligonucléotide

- Ajouter à la mixture.

ADN simple brin	200 ng
Oligonucléotide phosphorylé	1 à 10 pmole
Tampon d'appariement	2 μl
H_2O	ajuster à 20 μl

- Chauffer l'Eppendorf à 70°C, couper la chaleur et laisser refroidir progressivement jusqu'à 30°C (40 minutes), puis mettre sur glace.

Synthèse du brin complémentaire

- Ajouter dans l'Eppendorf tout en maintenant dans la glace.

Tampon synthèse	2 μl
T4 ligase 1U/μl	1 μl
T4 polymérase 1U/μl	1 μl

- Mélanger. Incuber 5 minutes sur glace, 5 minutes à température ambiante et 90 minutes à 37°C, puis replacer dans la glace.
- Ajouter 80 μl de tampon d'arrêt.
- Transformer des cellules TG1 compétentes avec 3 à 10 μl de la mixture précédente.

2.2.Techniques relatives aux protéines

2.2.1.Production de la LDH

- Effectuer une préculture de la souche AR58 de *E. coli* transformée par le plasmide contenant le gène de la *LDH* et le promoteur (par ex. pGIPM10) dans 10 ml de LB et 10 µl d'ampiciline à 32°C sous agitation.
- Effectuer une culture de 100 ml de LB (+ 100 µl d'ampiciline) avec 100 µl de préculture.
- Incuber la culture dans un bain à 32°C jusqu'à DO 0,4 (3 à 4 heures).
- Transférer rapidement cette culture dans un bain à 42°C pendant 4 heures.
- Centrifuger 10 minutes à 5000 g à 4°C.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot avec 10 ml de tampon phosphate 50 mM (pH 7,5).
- Centrifuger 10 minutes à 5000 g à 4°C.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot avec 2 ml de tampon phosphate 50 mM (pH 7,5).
- Soniquer 5 fois 15 secondes avec 30 secondes d'intervalle (sur glace).
- Centrifuger 30 minutes à 13000 g (à 4°C).
- Récupérer le surnageant et conserver à 4°C.

2.2.2.Purification de la LDH de muscle de lapin: méthodes chromatographiques

Les colonnes à chromatographie que nous utilisons sont de type FPLC (fast protein liquid chromatography). Le protocole décrit ci-dessous s'effectue dans l'ordre indiqué et utilise deux méthodes de chromatographie complémentaires.

2.2.2.1.Chromatographie d'affinité

La colonne de type **Blue-Sepharose** est une méthode de chromatographie utilisant des interactions spécifiques. Un analogue du NADH est fixé sur le gel. Les enzymes utilisant se type de coenzyme vont être retenues (interactions faibles) dans la colonne. L'élution se fera par un gradient de NADH 0,2 mM/NaCl 1M qui va entrer en compétition avec l'analogue de la colonne. Le débit de la colonne est de 1 ml/minute et son volume est de 5 ml..

- Diluer la fraction récoltée dans 2 ml de tampon phosphate 50 mM à pH 7,5.
- Equilibrer la colonne avec du tampon phosphate 50 mM à pH 7,5.
- Ajouter l'échantillon, après un lavage pendant 30 minutes avec du tampon phosphate 50 mM (pH 7,5), et éluer avec un gradient NaCl de 0 à 1 M / NADH de 0 à 0,2 mM.
- Collecter la fraction LDH et vérifier son activité.
- Précipiter la fraction collectée avec du sulfate d'ammonium (430 g/L).
- Centrifuger 20 minutes à 10000 g.
- Resuspendre le culot dans 200 µl de tampon phosphate 50 mM à pH 7,5.

2.2.2.2.Chromatographie sur tamis moléculaire

Le gel utilisé contient des grains d'agarose possédant des pores de taille fixe. Les molécules de taille plus importante que les pores ne pénétreront pas dans ces grains et vont être élués plus rapidement. Par contre, les molécules de taille inférieure aux pores vont être éluées plus lentement. La vitesse d'élution sera fonction du volume de la protéine et donc, approximativement, de son poids moléculaire.
Nous passerons l'échantillon sur une colonne de type **Superose12HR**, cette colonne convient pour séparer des protéines dont le poids moléculaire est compris entre 1.000 et 300.000. La colonne a un débit de 0,5 ml/minute et un volume de 25 ml.

- Equilibrer la colonne avec du tampon phosphate 50 mM à pH 7,5.
- Ajouter l'échantillon sur la colonne et éluer avec du tampon phosphate 50 mM à pH 7,5.
- Récolter la fraction LDH.
- Stocker à 4°C.

2.2.3.Dosage colorimétrique des protéines (Lowry et al., 1951)

Cette méthode permet d'estimer la concentration totale de protéines d'une solution. Le réactif de Folin (jaune) est réduit en un colorant bleu par les AA aromatiques (Tyr et Trp) des protéines. La lecture du résultat est réalisée grâce au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm.

- Diluer l'échantillon à doser à 250 μl avec le même tampon que celui de l'échantillon.
- Ajouter 1,25 ml de solution E préparée extemporanément .
- Mélanger et laisser 10 minutes sur table.
- Ajouter 125 μl de réactif de Folin dilué 2X.
- Mélanger et laisser 30 minutes sur table.
- Lire l'absorbance à 750 nm.

L'étalonnage est réalisé avec des solutions de BSA de concentrations connues (0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,5 mg/ml et 0,7 mg/ml).

2.2.4.Dosage des protéines à 280 nm

La plupart des protéines absorbent à 280 nm (ultraviolet), ceci est dû aux groupes phénol des tyrosines et aux groupes indol des tryptophanes. On peut ainsi, de manière simple, estimer la concentration d'une protéine donnée en utilisant la loi de Lambert-Beer : $E = \varepsilon_\lambda\ c\ d$ avec E, ε_λ, c, d représentants respectivement l'absorbance, le coéfficiant d'extinction molaire (40700 $dm^3/(mole.cm)$ pour la L-LDH de muscle de lapin), la concentration de la protéine et la distance parcourue par le rayon dans la solution testée (Principles and techniques of practical biochemestry, 1986).

- Diluer l'échantillon avec le même tampon que celui de l'échantillon, prélever 1 ml.
- Lire l'absorbance à 280 nm.

Le blanc est réalisé avec le tampon utilisé pour obtenir la solution de protéines

2.2.5. Dosage de l'activité de la LDH

La L-LDH oxyde le NADH en NAD^+ en présence de pyruvate. Le NADH a un maximum d'absorbance à 340 nm tandis que l'absorbance du NAD^+ est nulle à cette longueur d'onde. La disparition du NADH peut être suivie au cours du temps par spectrophotométrie.

Mettre dans une cuvette en quartz de 1 ml.
- 700 µl de tampon citrate 50 mM pH 6,0
- 100 µl de NADH (2 M)
- 100 µl de substrat (*)
- 100 µl d'enzyme (éventuellement dilué)

Mélanger et lire l'absorbance à 340 nm en continu pendant 2 minutes.

*La nature du substrat et sa concentration sont variables. Nous utiliserons du pyruvate dont les concentrations vont de 0,025 mM à 1 mM.

2.2.6. Electrophorèse en gel SDS-polyacrylamide

Il s'agit de soumettre une molécule chargée à une différence de potentiel. Cette molécule migre dans un gel vers le pôle positif, de charge opposée à celle de la protéine. La vitesse de migration est principalement fonction de la charge globale et de la taille de la protéine ainsi que de la concentration du gel et de la différence de potentiel appliquée. Le SDS charge négativement et dénature toutes les protéines et la ddp appliquée reste constante. Le seul facteur influançant la vitesse de migration des protéines sera donc le poids moléculaire de celles- ci.
Nous utilisons un gel de type polyacrylamide composé de 2 parties. Le "stacking" gel permet d'affiner la résolution de l'électrophorèse. Le "running" gel permet la séparation des protéines.

"Running" gel:
- Acrylamide 30 % bisacrylamide 0,8 % 3 ml
- Tris 1,5 M SDS 0,4 % pH 8,8 1,875 ml
- Eau distillée 2,25 ml

Mélanger.
Ajouter au moment de couler dans la cuve à électrophorèse:
- Persulfate d'ammonium 1 % 375 µl
- TEMED 7,5 µl

"Stacking" gel:
- Acrylamide 30 % bisacrylamide 0,8 % 0,5 ml
- Tris 0,5 M SDS 0,4 % pH 6,8 1,25 ml
- Eau distillée 2,75 ml

Mélanger.
Ajouter au moment de couler au dessus du "Running gel":
- Persulfate d'ammonium 1 % 500 μl
- TEMED 5 μl

Préparation du gel
- Couler le "running" gel (hauteur: 4/5 de la vitre) et laisser polymériser 30 minutes.
- Couler le "stacking" gel et laisser polymériser, après avoir ajouter un "peigne", 30 minutes.

Préparation des échantillons
- Solution SB 5X 4 μl
- Solution de protéines 1 à 30 μg suivant la coloration utilisée
- Eau distillée porter à un volume de maximum 20 μl
- Placer les échantillons dans un bain à 100°C pendant 3 minutes et charger le gel.

Migration.
- Migrer de 90 minutes à 3 heures à 120 volts dans du tampon TBE.

Coloration au bleu de Coomassie
- Enlever le gel de la cuve.
- Placer le gel dans la solution de coloration au bleu de Coomassie 30 minutes
- Le placer ensuite dans la solution de décoloration 30 minutes
- Terminer par une incubation dans la solution de fixation 10 minutes
- Sécher le gel (sous vide) entre 2 feuilles de cellophane 120 minutes

Coloration au nitrate d'argent (Morissey, 1981)
- Enlever le gel de la cuve.
- Préfixer le gel dans un mélange de 50 % éthanol (v:v), 10 % acide acétique (v:v) et 40 % d'eau (v:v). 30 minutes
- Placer le gel dans un mélange de 5 % éthanol (v:v), 7 % acide acétique (v:v) et 88 % d'eau (v:v). 30 minutes
- Incuber dans une solution de glutaraldéhyde à 10 % (v:v) 30 minutes
- Rincer dans un grand volume d'eau distillée une nuit
- Incuber dans une solution de dithiothréitol à 0,5 mg/100 ml 30 minutes
- Incuber dans une solution de nitrate d'argent à 0,1 % (w:v) 30 minutes
- Rincer à l'eau distillée puis à la solution révélatrice
- Incuber dans le révélateur jusqu'à obtention de la coloration désirée
- Arrêter la réaction avec une solution d'acide acétique 3 % 10 minutes
- Incuber le gel dans une solution à 0,03 % de Na_2CO_3 10 minutes
- Sécher le gel (sous vide) entre 2 feuilles de céllophane 120 minutes

Résultats

1.Introduction

Afin de contribuer à l'étude des bases moléculaires de la stéréospécificité la L-LDH de muscle de lapin envers le substrat, nous avons muté le résidu glutamine 102 de cette enzyme en arginine.

Le phage M13LDH, dans lequel est inséré une partie du gène *LDH*, comprenant le codon correspondant à la glutamine 102, nous a permis d'utiliser la technique de mutagenèse dirigée de Kunkel. Par la suite, les mutants ont été sélectionnés grâce à un nouveau site de restriction engendré par la mutation. Le phage obtenu est noté M13LDH* (* représentant la mutation correspondant à la substitution glutamine 102 en arginine, Q102R). Ensuite, une portion du gène *LDH** a été insérée dans un plasmide porteur du gène *LDH* complet (pGRtM12), pour obtenir un plasmide porteur du gène *LDH** complet, pINT (plasmide intermédiaire). Enfin, une portion du gène *LDH** a été insérée dans le plasmide d'expression pGIPM10, en vue de la production de la L-LDH* (LDH Q102R). Le plasmide d'expression de la L-LDH* fut appelé pV3. Nous avons ensuite surproduit la L-LDH* par l'intermédiaire d'une souche de *E. coli* (AR58) transformée par pV3. Cette enzyme mutante a été partiellement purifiée par chromatographie, par passages successifs sur une colonne d'affinité et sur un tamis moléculaire. La fraction finale, après évaluation du degré de pureté, a permis de réaliser des mesures cinétiques préliminaires permettant la caractérisation du mutant.

Oligonucléotide de 20 bases — 3' -CCC-CGT-GCC-GCG-GTT-CTC-CCT- 5'

Simple brin M13 LDH* position 6591 — 5' -GGG-GCA-CGG-CGC-CAA-GAG-GGA- 3' — Arginine 1

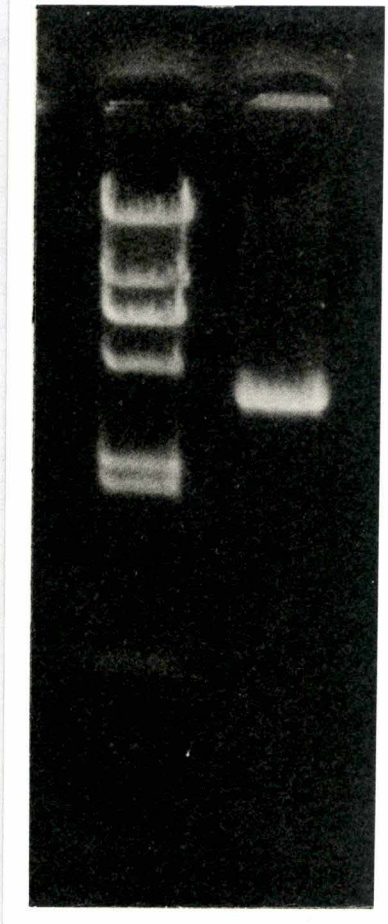
Simple brin M13 LDH position 6591 — 5' -GGG-GCA-CGG-CAG-CAA-GAG-GGA- 3' — Glutamine

***Nar* I**

5' . . . G G C G C C . . . 3'
3' . . . C C G C G G . . . 5'

figure 2.1

1 2



_____ 7725 b (SS)

Piste1 : λ/*Hind* III
Piste2 : M13LDH SSU

fig. 2.2

2.Mutagenèse dirigée

2.1.Choix de la séquence de l'oligonucléotide de mutagenèse

La glutamine 102 de la L-LDH est codée par un codon CAG. Afin de substituer ce résidu par une arginine, nous avons utilisé un oligonucléotide de 20 bases, ce qui permet de remplacer le codon CAG par CGC, ce dernier codant pour une arginine (figure 2.1). Cette substitution entraîne la formation d'un second site de restriction *Nar* I dans la séquence de M13LDH*. L'oligonucléotide de mutagenèse s'apparie en position 6600 sur la matrice simple brin de M13LDH à une température de 63°C (Tm). A cette température, aucun appariement non désiré ou structure secondaire n'est prédit.

2.2.Préparation de simple brin uracilé

Nous avons effectué une maxipréparation d'ADN simple brin de phage M13LDH. 10 ng de cette préparation ont été utilisés pour transfecter la souche CJ236 de *E. coli*. Le mélange de transfection a été étalé sur Hplate agar et incubé à 37°C. Ensuite, nous avons effectué une maxipréparation d'ADN simple brin uracilé de M13LDH à partir d'une des plages de lyse obtenues. La migration sur gel d'agarose (0,8 %) de l'ADN obtenu est représentée sur la figure 2.2, elle permet d'estimer la quantité de simple brin uracilé à environ 15 μg (300 ng/μl).

2.3.Réaction de mutagenèse dirigée

L'étape suivante consiste à ajouter 3,2 pmole de l'oligonucléotide de mutagenèse purifié et phosphorylé à la mixture d'hybridation contenant 300 ng du M13LDH simple brin uracilé. Après hybridation de l'oligonucléotide, synthèse et ligation du brin complémentaire, 1, 3 et 10 μl de la mixture obtenue permettent de transformer la souche TG1 de *E. coli*.

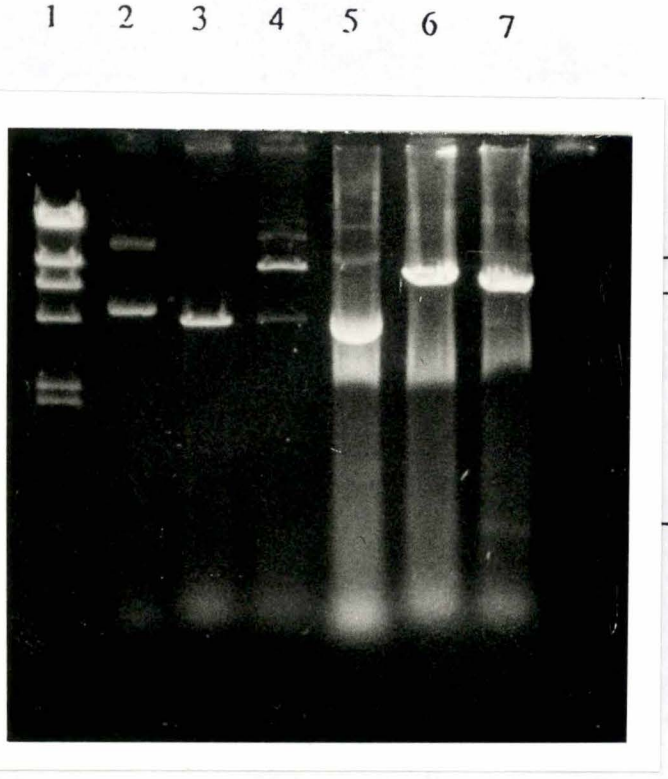

1 2 3 4 5 6 7
4356 pb
7725 pb
7115 pb
610 pb
Piste1 : λ/Hind III
Piste2 : pGRtM12 non res
Piste3 : pGRtM12/Bst XI
Piste5 : M13LDH* non res
Piste6 : M13LDH*/Bst XI
Piste7 : M13LDH*/Nar I

fig. 2.3

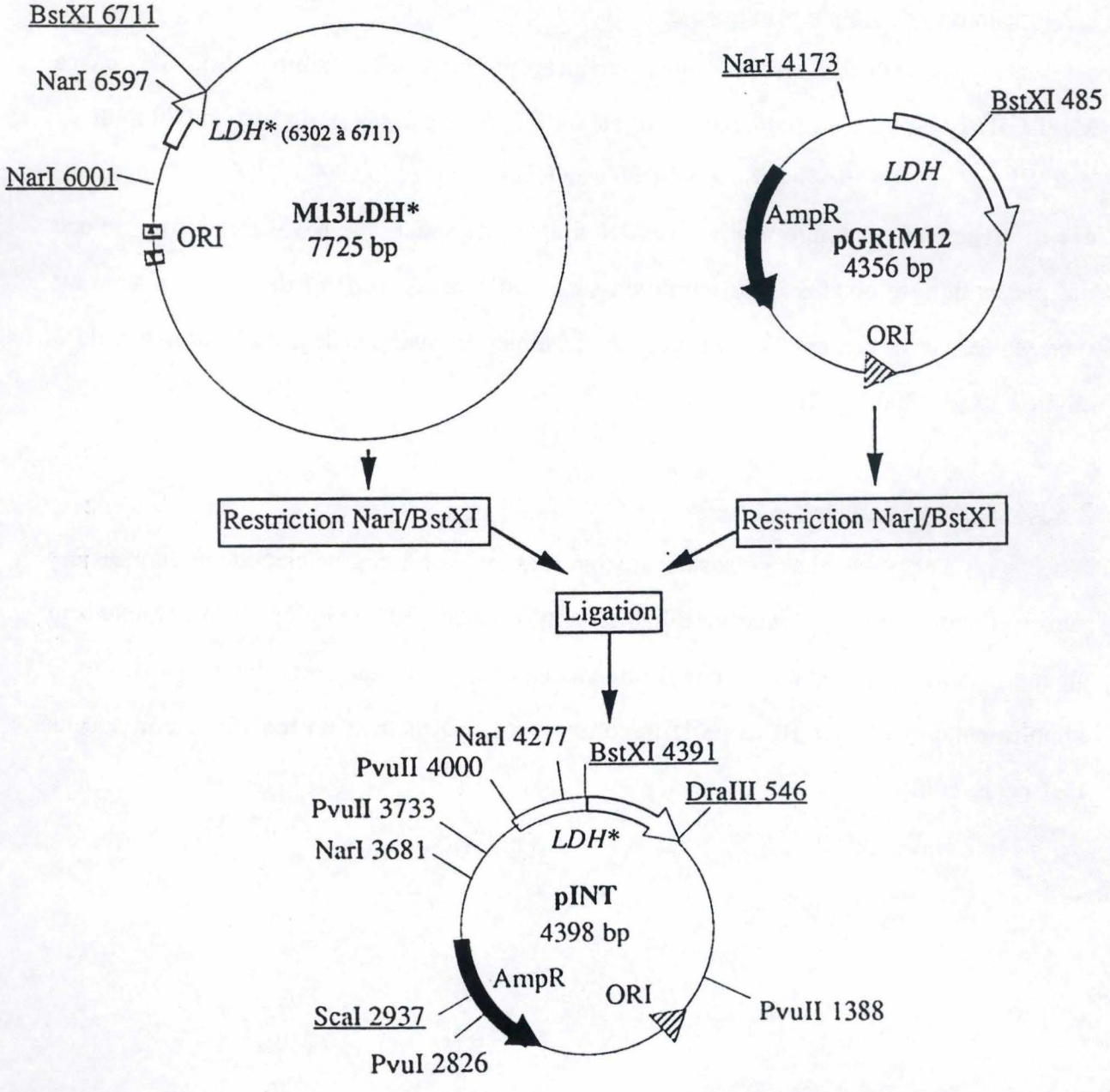

BstXI 6711
NarI 6597
LDH* (6302 à 6711)
NarI 6001
ORI
M13LDH*
7725 bp
NarI 4173
BstXI 485
LDH
AmpR
pGRtM12
4356 bp
ORI
Restriction NarI/BstXI
Restriction NarI/BstXI
Ligation
NarI 4277
BstXI 4391
PvuII 4000
DraIII 546
PvuII 3733
NarI 3681
LDH*
pINT
4398 bp
AmpR
ORI
PvuII 1388
ScaI 2937
PvuI 2826

fig 2.

2.4. Recherche des mutants

Nous avons réalisé 48 minipréparations d'ADN double brin à partir des plages de lyse obtenues précédemment. L'analyse du profil de restriction de ces minipréparations a permis de détecter un mutant M13LDH*.

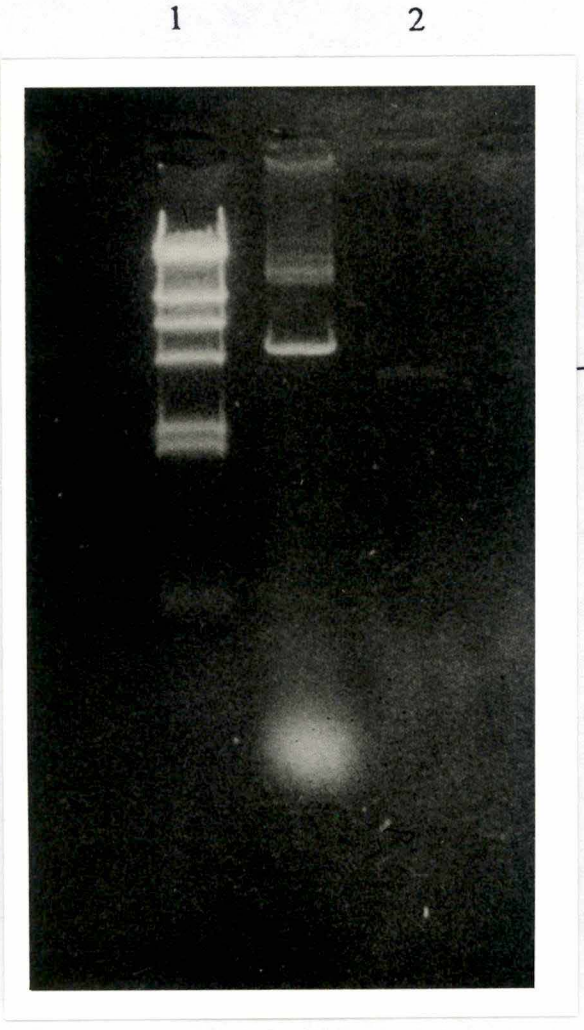
La détection des mutants est basée sur l'apparition d'un nouveau site de restriction en position 6600 dans M13LDH*, en l'occurence le site reconnu par *Nar* I. Cependant, un autre site de restriction *Nar* I est présent en position 6001. Le profil de la restriction par *Nar* I de l'ADN double brin du phage M13LDH*, obtenu par électrophorèse en gel d'agarose 0,8 %, doit être constitué de 2 bandes d'ADN correspondant à une taille de respectivement 7125 pb et 600 pb (figure 2.4).

Nous avons ensuite réalisé une midipréparation d'ADN double brin de ce mutant. L'analyse sur gel du profil de restriction *Nar* I de cette préparation, nous a permis de confirmer l'apparition du nouveau site de restriction *Nar* I et d'évaluer la quantité d'ADN obtenue à 35 μg (350 ng/μl) (figure 2.3).

3. Construction de pINT

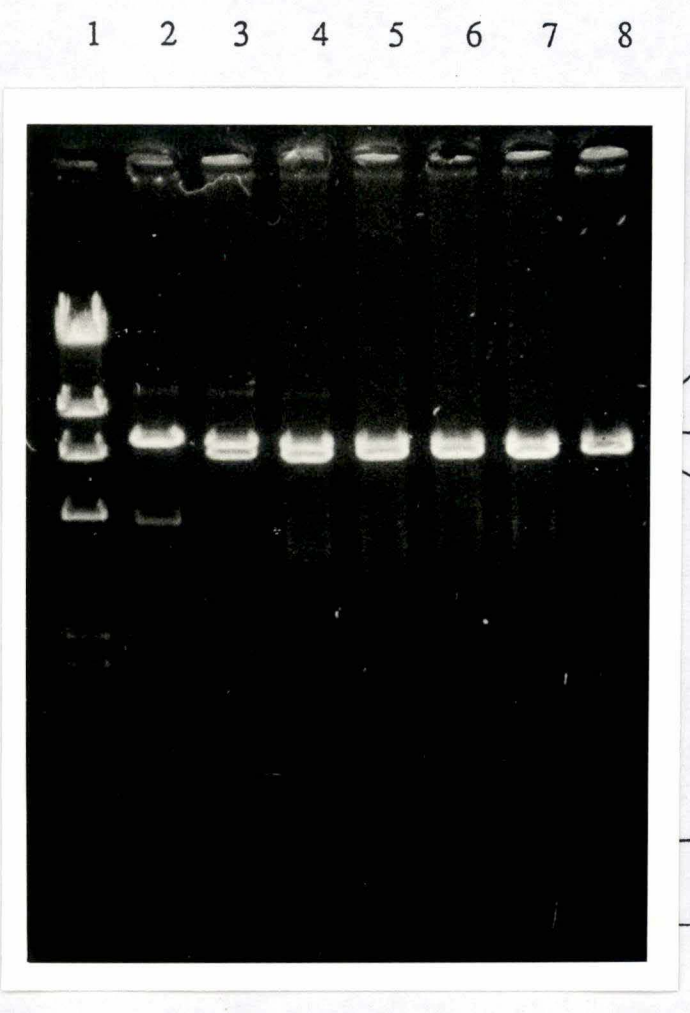
3.1. Stratégie (figure2.4)

Nous avons inséré la partie du gène *LDH** comprenant la mutation correspondant à Q102R dans le plasmide pGRtM12. Celui-ci a été restreint par les enzymes *Nar* I et *Bst* X I. La matrice (fragments allant de la position 485 à 4173) a été récupérée par la méthode "Prep-a-Gene" (BIO-RAD). Ensuite, l'ADN double brin de M13LDH* a été restreint par *Bst* XI et partiellement restreint (environ 50 %) par *Nar* I de façon à obtenir un mélange de 4 fragments de 7015, 710, 596 et 114 pb. Après ligation et transformation, nous avons recherché la construction de 4398 pb correspondant à l'insertion du fragment *Nar* I - *Bst* XI de 710 pb dans la matrice de 3688 pb.



Piste1 : λ/*Hind* III
PIste2 : Matrice (3688 pb)

fig. 3.1



Piste1 : λ/*Hind* III
Piste2 : M13LDH*/*Nar* I (0')
Piste3 : M13LDH*/*Nar* I (5')
Piste4 : M13LDH*/*Nar* I (10')
Piste5 : M13LDH*/*Nar* I (15')
Piste6 : M13LDH*/*Nar* I (20')
Piste7 : M13LDH*/*Nar* I (30')
Piste8 : M13LDH*/*Nar* I (60')

fig. 3.2

3.2.Préparation de la matrice

Nous avons réalisé une midipréparation de pGRtM12 (4356 pb) dont la concentration est estimée à 100 ng/μl (figure 2.3). 2 μg de cette préparation ont été restreints par *Bst* XI; nous avons ensuite extrait les protéines au phénol et restreint ce mélange avec *Nar* I. L'estimation de la quantité de matrice récupérée (fragment de 3688 pb) après migration sur gel d'agarose 0,8 % est de 100 ng (figure 3.1).

3.3.Préparation de l'insert

3,5 μg de la midipréparation de M13LDH* ont été restreints par *Bst* XI. Nous avons ensuite extrait les protéines au phénol et obtenu une solution contenant 2 μg d'un fragment de 7725 pb. Un test de restriction partielle nous a permis d'approximer le temps nécessaire pour que 50 % de l'ensemble des sites de restriction *Nar* I présents soient clivés. La figure 3.2 montre les profils de restriction au cours du temps d'incubation avec l'enzyme *Nar* I. Nous avons choisi de restreindre le fragment de 7725 pb pendant 10 minutes par l'enzyme *Nar* I. Cette restriction a été directement suivie par une extraction des protéines au phénol.

3.4.Ligation et transformation

Le mélange de ligation (25 μl) était constitué de 65 ng de la préparation de matrice et 300 ng de la préparation d'insert. Des cellules compétentes de la souche TG1 de *E. coli* ont été transformées par 20 μl de ce mélange de ligation et ont été étalées sur milieu sélectif (LB-Amp).

3.5.Recherche de la construction pINT

Le milieu contenant de l'ampicilline permet de sélectionner les colonies transformées par un plasmide possédant une résistance à l'ampicilline (Amp^R), en l'occurence pINT. Nous avons réalisé une minipréparation d'ADN à partir de 12 colonies choisies au hasard. Le résultat de la restriction par l'enzyme *Dra* III des 12

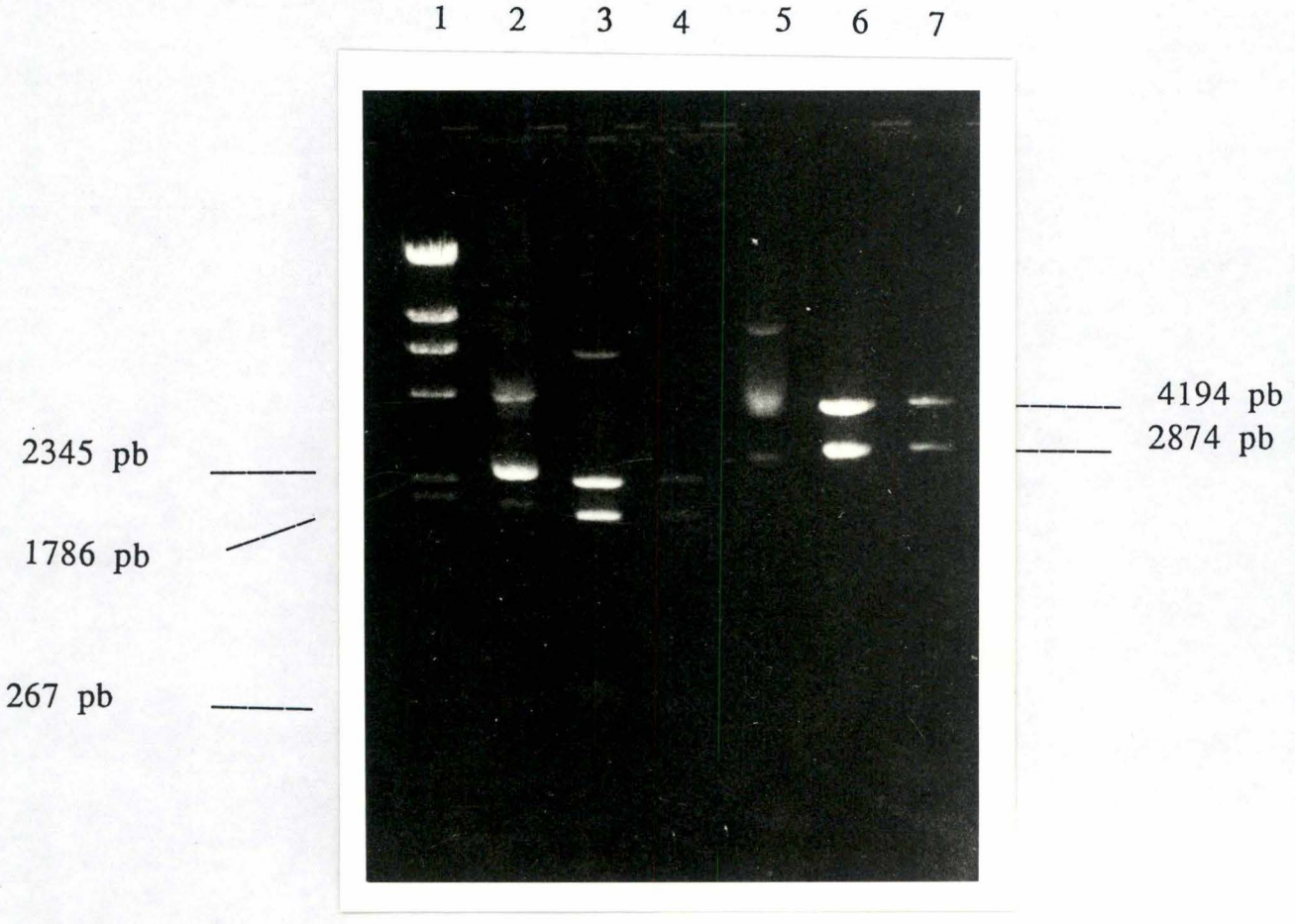


fig. 3.3

Piste1 : λ/*Hind* III
Piste2 : pInt non restreint
Piste3 : pInt/*Pvu* II
Piste5 : pGIPM10 non restreint
Piste6 : pGIPM10/*Pvu* II

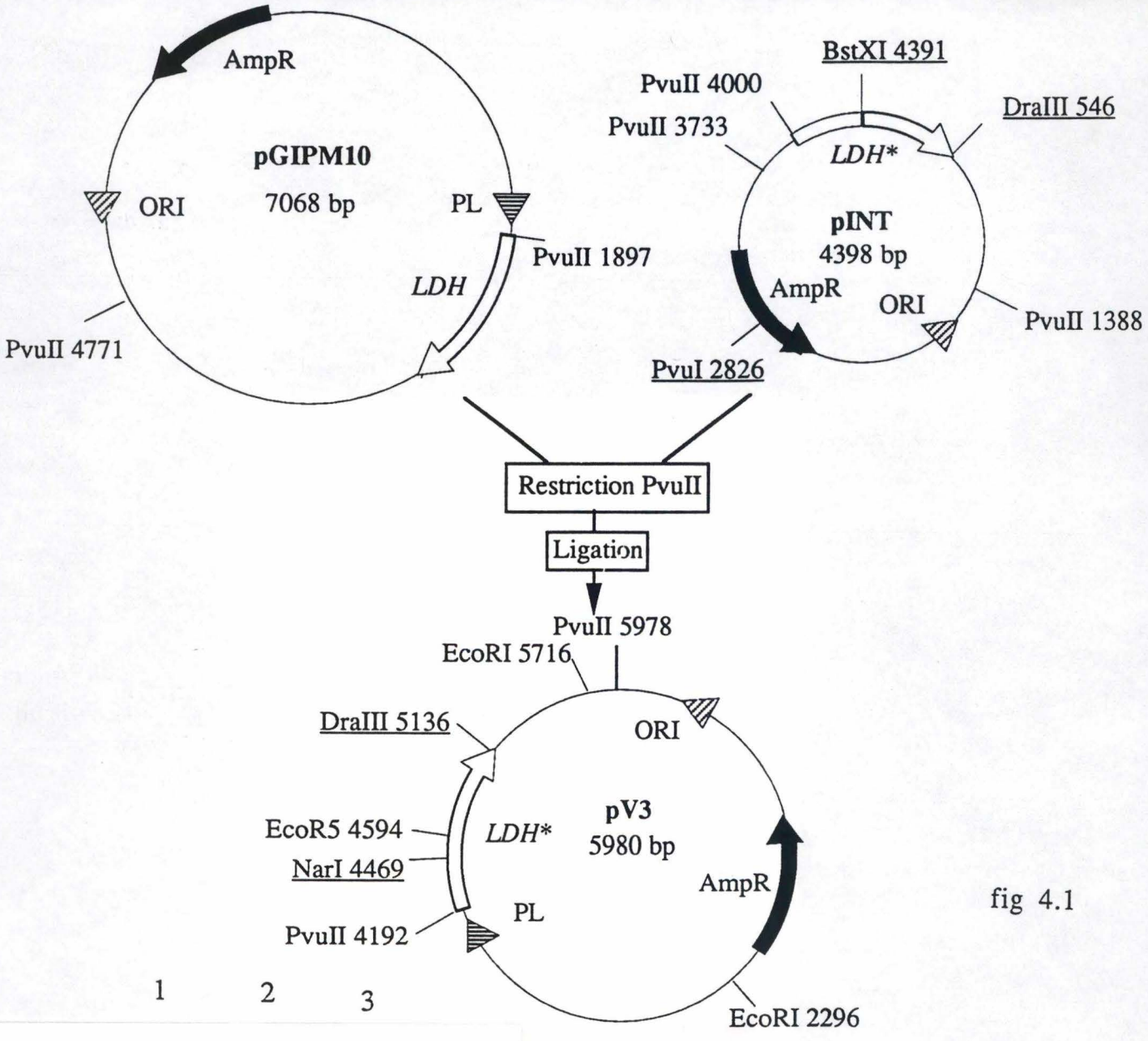
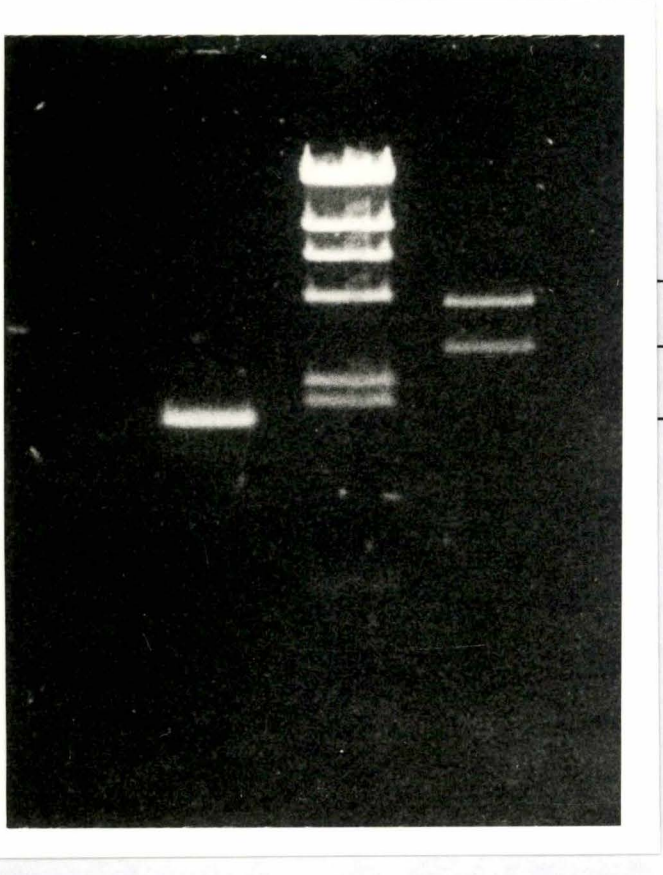


fig 4.1



4194 pb

2874 pb

1786 pb

Piste1 : insert (1786 pb

Piste2 : λ/*Hind* III

Piste3 : pGIPM10/*Pvu* I

fig. 4.2

minipréparations a été analysé sur gel d'agarose 0,8 %. Sur les 12 constructions obtenues, 5 correspondent au profil attendu (1 fragment de 4398 pb). Une midipréparation d'une des 5 constructions a été réalisée. Une partie de cette préparation est restreinte par l'enzyme *Pvu* II et analysée sur gel (figure 3.3), ce qui permet de confirmer la construction pINT (3 fragments de 2345, 1786 et 267 pb) et d'évaluer la concentration de la préparation à 25 μg.

4. Construction de pV3

4.1. Stratégie (figure 4.1)

Il s'agit d'insérer un fragment de 1786 pb, contenant le gène *LDH** cloné dans le plasmide pINT, dans une matrice de 4194 pb formée à partir de pGIPM10 (figure 4.1). L'enzyme *Pvu* II (qui engendre des bouts francs) va restreindre le plasmide pGIPM10 aux positions 1897 et 4771. Deux fragments vont être formés, dont l'un sera la matrice du plasmide pV3 (4194 pb). D'autre part, la restriction du plasmide pINT par *Pvu* II engendre 3 fragments de 2345, 1786 et 267 pb. Afin de limiter le nombre de constructions possibles, nous avons récupéré le fragment de 1786 pb (insert) sur gel d'agarose. De plus, un large excès d'insert a été prévu, car la probabilité que les deux bouts francs de la matrice soient ligués l'un à l'autre est très élevée.

4.2. Préparation de la matrice

Nous avons réalisé une midipréparation du plasmide pGIPM10 dont la quantité a été estimée à 10 μg (figure 3.4). Après restriction d'un μg de cette préparation par l'enzyme *Pvu* II (suivie d'une extraction au phénol), nous avons estimé la quantité du mélange de restriction (fragment de 4194 pb correspondant à la matrice et de 2874 pb) à 700 ng (figure 4.2).

1 2 3 4 5 6 7

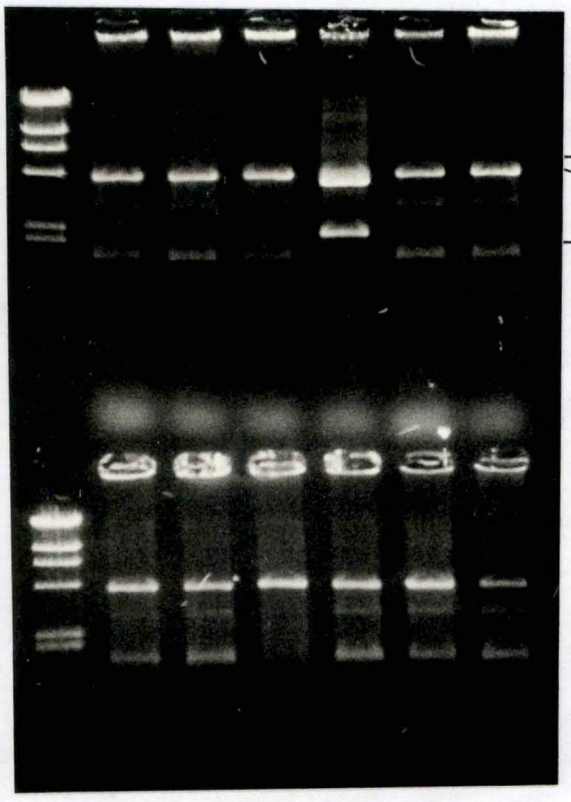


fig. 4.3

9 10 11 12 13 14 15

Recherche de la construction pV3 :

Piste1 : λ/*Hind* III
Piste 2 à 7 : Minipréparations d'ADN plasmidique/*Eco* RI
Piste 9 : λ/*Hind* III
Piste 10 à 15 : Minipréparations d'ADN plasmidique/*Eco* RI

Les pistes 2,3,4,6,7,10,11,12,13,14 et 15 correspondent à des plasmides de 4194 pb (matrice religuée sur elle-même).
La piste 5 correspond à un plasmide de 5980 pb (matrice contenant l'insert mais dans le sens empêchant la reconstitution de la séquence codante du gène *LDH*)

4.3. Préparation de l'insert

Nous avons restreint 2,5 μg de la midipréparation du plasmide pINT par l'enzyme *Pvu* II, et le fragment de 1786 pb a été récupéré par la méthode de Dretzen, sur gel d'agarose 1,2 %. L'analyse électrophorétique sur gel d'agorose 0,8 % a permis d'estimer la quantité du fragment récupéré (insert) à 1,2 μg (figure 4.2).

4.4. Ligation et transformation

Le mélange de ligation (20 μl) était constitué de 25 ng de la matrice et de 500 ng d'insert. Des cellules glycérolées de *E. coli* AR58 ont été transformées par 5 μl de ce mélange par électroporation, et ont été étalées sur un milieu sélectif (LB-Amp-Tet) à 42°C.

4.5. Recherche de la construction

L'insert peut se liguer à la matrice dans deux sens (figure 4.1). Or il est indispensable que l'insert contenant la séquence codante du gène de la *LDH** se positionne de manière adéquate par rapport au promoteur. Afin de distinguer les deux constructions, il est nécessaire de restreindre les plasmides en deux sites, l'un se trouvant dans l'insert, et l'autre dans la matrice.

Nous avons préparé l'ADN (miniprépararion) de 120 colonies sélectionnées sur milieu ampicilline. Suite à la restriction par *Eco* RI et la migration sur gel d'agarose (0,8 %) de ces plasmides, nous avons détecté 3 types de clones. Le premier type, majoritaire (117 colonies), est un plasmide de 4194 pb correspondant à la matrice non recombinante. Le deuxième type, représenté deux fois, est restreint par *Eco* RI en deux sites et le profil électrophorétique observé, 2 fragments de 2158 et 3822 pb, correspond à l'insertion du fragment porteur du gène de *LDH** dans la matrice mais dans le sens où la séquence codante du gène *LDH** n'est pas reconstituée (figure 4.3; piste 5). Un troisième type, détecté une fois, est restreint par *Eco* RI en trois sites (3 fragments de 1800, 2560 et 3420 pb) (figure 4.4; piste 3). Il correspond à une triple ligation, la matrice ayant intégré deux inserts en tandem, en reconstituant la séquence codante du gène *LDH**. La présence de

1 2 3 4 5 6 7

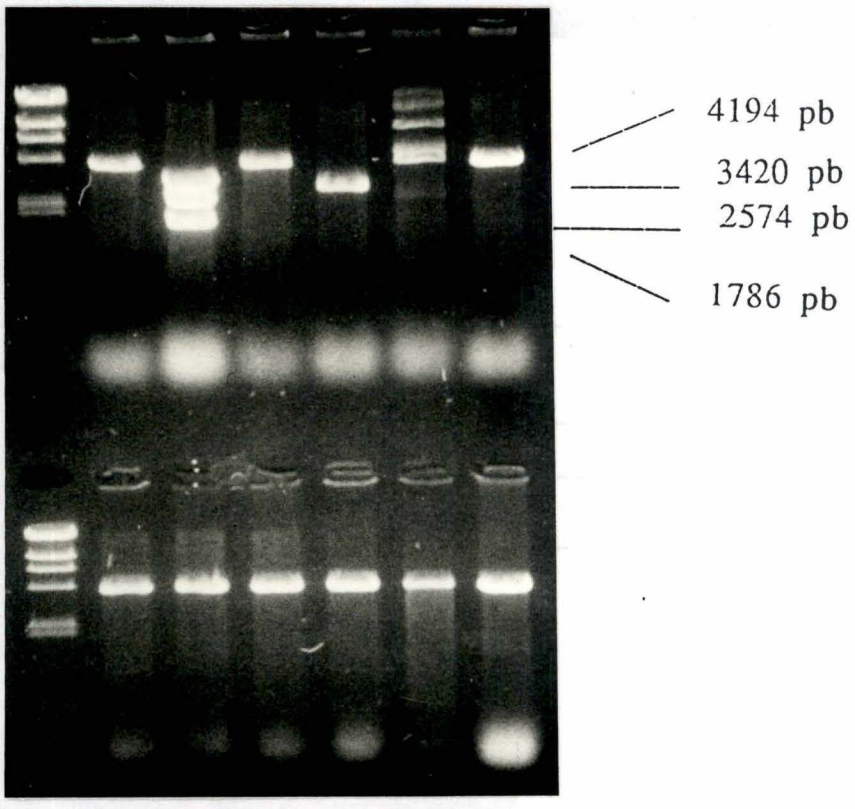


fig. 4.4

9 10 11 12 13 14 15

Recherche de la construction pV3 :

Piste1 : λ/*Hind* III
Piste 2 à 7 : Minipréparations d'ADN plasmidique/*Eco* R I
Piste 9 : λ/*Hind* III
Piste 10 à 15 : Minipréparations d'ADN plasmidique/*Eco* R I

Les pistes 2,4,7,8,10,11,12,13,14 et 15 correspondent à des plasmides de 4194 pb (matrice religuée sur elle-même).
La piste 5 correspond à pV3.

1 2 3 4 5



5994 pb

3420 pb

2574 pb

1786 pb

Piste1 : λ/*Hind* III
Piste2 : Fragment à 1786 pb
Piste3 : pV3/*Eco* RI
Piste4 : pV3/*Eco* RV
Piste5 : pV3/*Nar* I

fig. 4.5

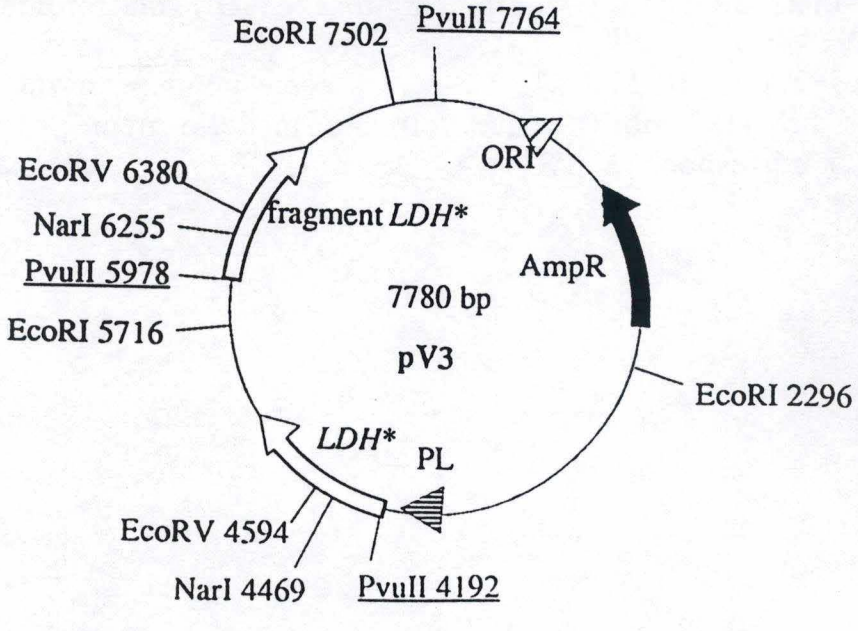


fig 4.6

deux inserts ne devrait en principe pas empêcher l'expression de L-LDH*, une des deux séquences codantes étant reconstituée et placée sous le contrôle du promoteur P_L. Nous avons ensuite réalisé une midipréparation de 20 μg de ce plasmide, appelé pV3. Une restriction de pV3 par l'enzyme *Nar* I (engendre deux fragments de 5994 et 1786 pb) a permis de confirmer la présence de la mutation correspondant à la substitution Q102R (figure 4.5).

4.6. Conclusion

Nous disposons donc d'un plasmide pV3 (figure 4.6) qui contient le gène de la *LDH** placé en aval du promoteur P_l. A priori, rien ne devrait empêcher l'expression de la L-LDH* par la souche AR58 de *E. coli* transformée avec le plasmide pV3. Nous sommes dès lors en mesure de produire cette L-LDH* et de caractériser, de façon préliminaire, les paramètres cinétiques de ce mutant.

Electrophorèse (coloration au bleu de Coomassie)

1: Fraction soluble *E. coli* / pV3: 20 µg
2: Fraction soluble *E. coli* / pV3: 30 µg
3: Fraction soluble *E. coli* / pOTSnco12: 4 µg
4: Fraction soluble *E. coli* / pOTSnco12: 6 µg
5: Marqueurs de taille "High": 3 µg
6: Marqueurs de taille "Low": 3 µg
7: LDH de muscle de lapin commerciale: 1 µg

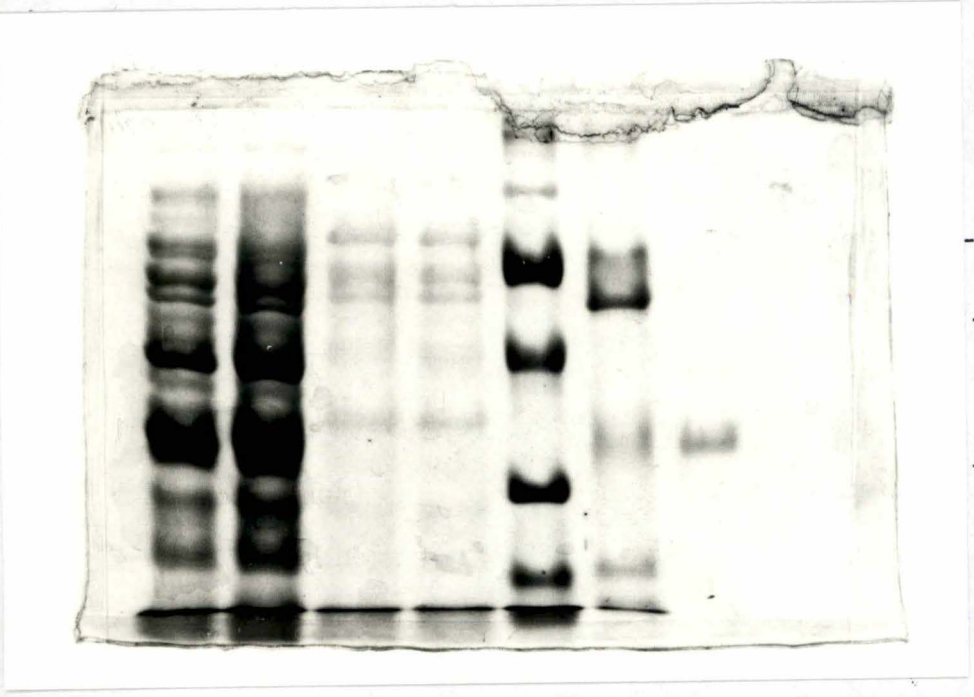


Figure 5.1

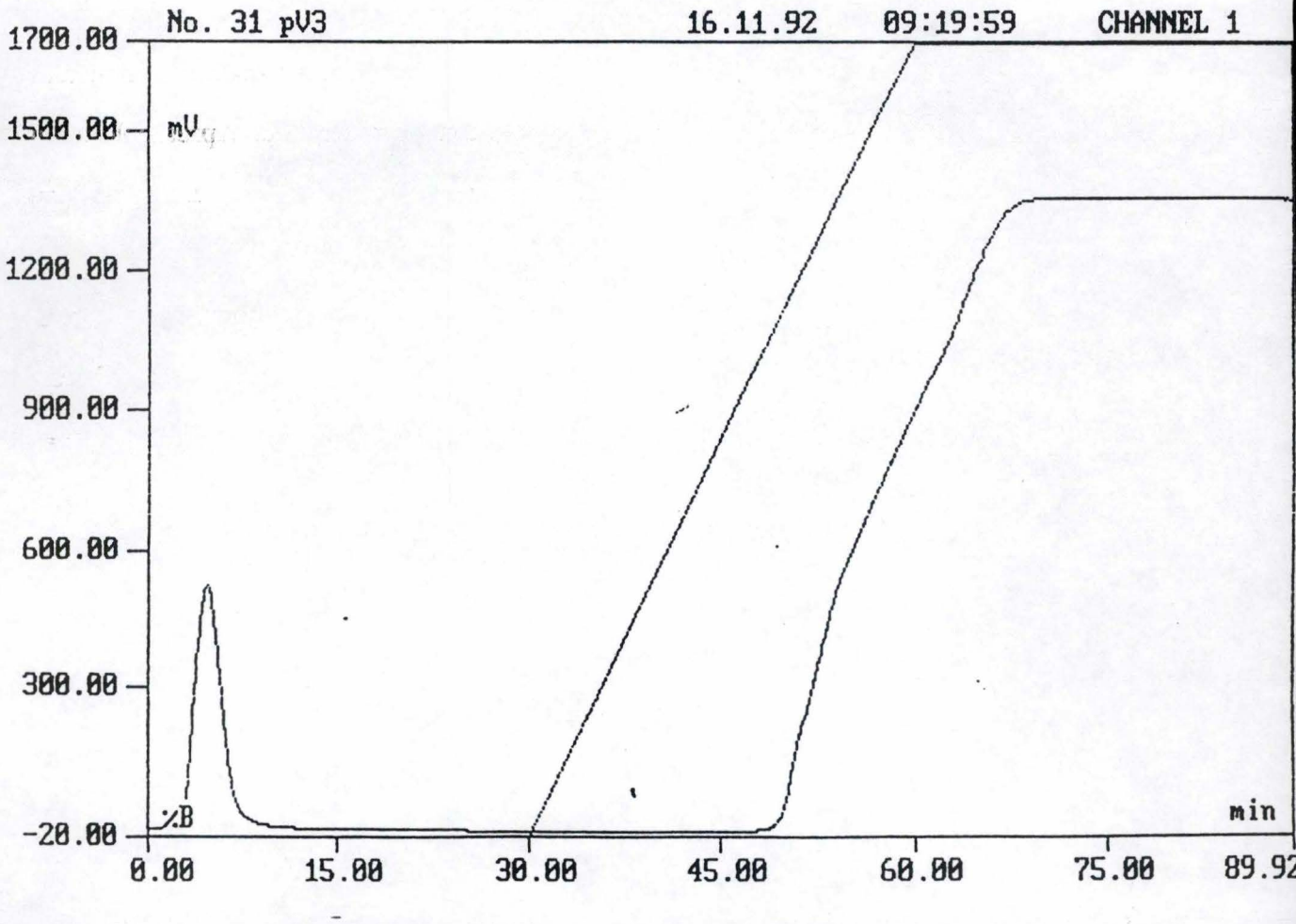


Figure 5.2 Graphe de l'élution des protéines par chromatographie d'affinité, avec en abcisse le (minute) et en ordonnée la ddp (mV).

5.Production et purification

5.1.Production

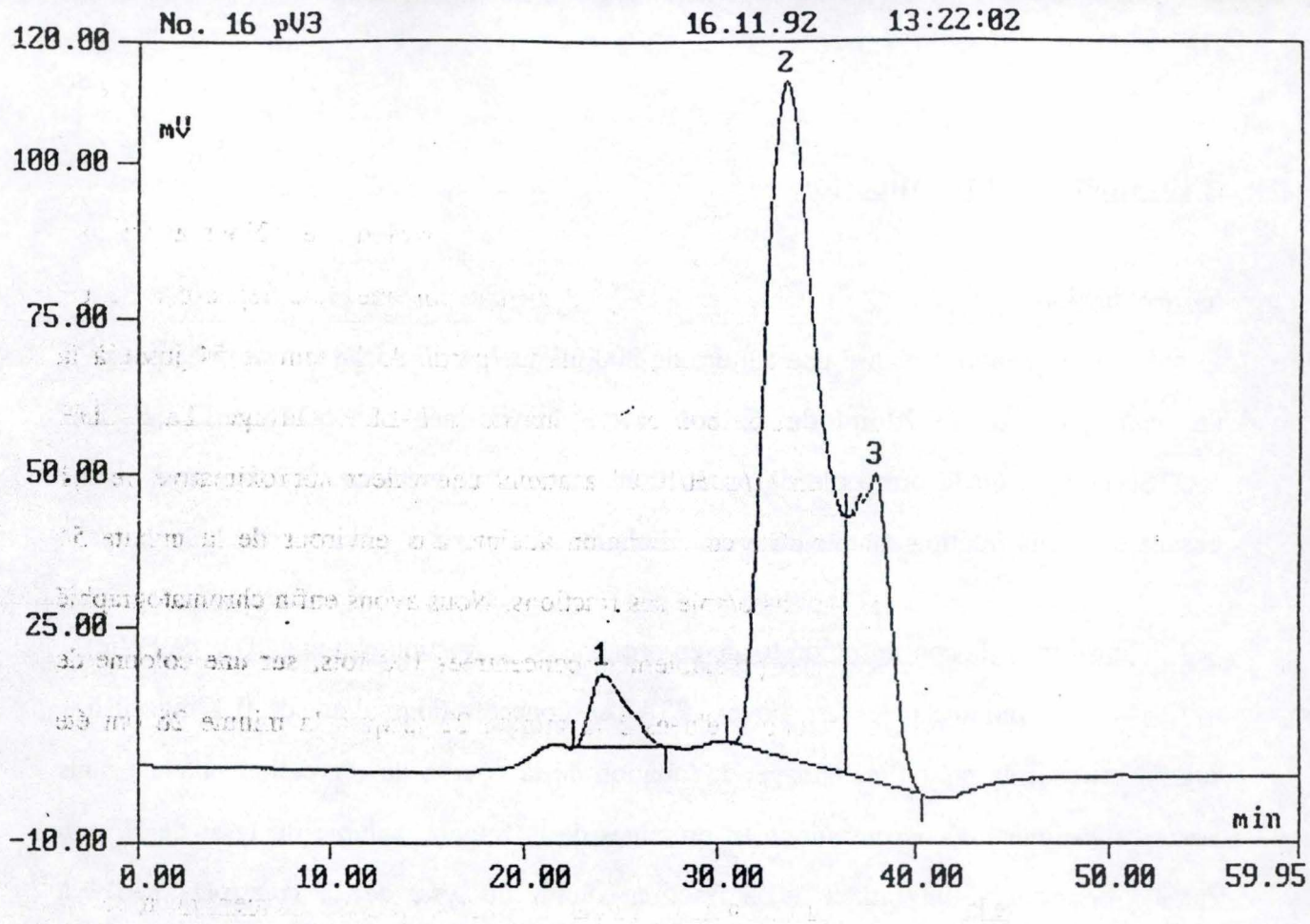
Nous avons réalisé une culture de 200 ml de *E. coli* AR58 transformée par pV3 (*E. coli* /pV3) et de 20 ml de *E. coli* AR58 transformée par pOTSnco12 (*E. coli* /pOTSnco12) selon le protocole de production (matériel et méthodes 2.2.1). Nous avons ensuite extrait la fraction soluble du lysat cellulaire.

5.2.Estimation de la concentration totale en protéine de la fraction obtenue (Test de Folin)

L'albumine de sérum bovin (BSA) en concentrations allant de 0,1 mg/ml à 1 mg/ml est utilisée pour l'étalonnage. L'équation de la courbe de régression obtenue nous permet d'estimer les concentrations en protéines de la fraction soluble du lysat de *E. coli* /pV3 à environ 0,3 mg/ml et de la fraction soluble du lysat de *E. coli* /pOTsnco12 à environ 0,1 mg/ml.

5.3.Vérification de la production par électrophorèse

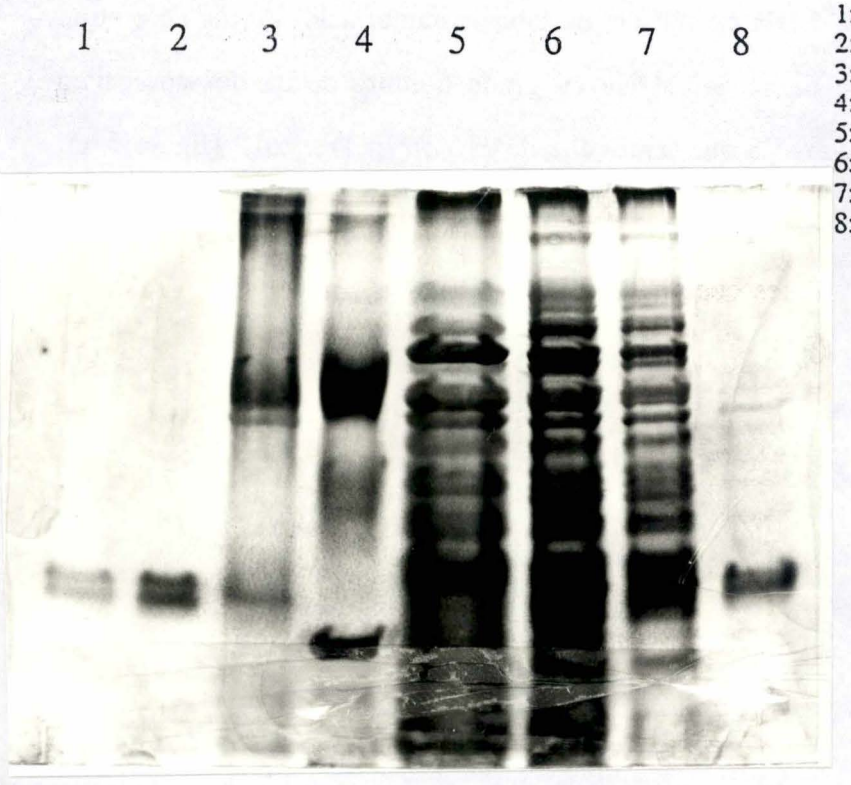
Nous avons effectué une électrophorèse, sur gel de polyacrylamide (acrylamide 30 % et bisacrylamide 0,8 %), en conditions dénaturantes, des fractions solubles obtenues précédemment, ainsi que de la L-LDH de muscle de lapin commerciale. Après coloration au bleu de Coomassie, l'analyse de ce gel révèle un grand nombre de bandes aussi bien pour la fraction soluble de *E. coli* /pV3 que pour celle de *E. coli* /pOTsnco12 (figure 5.1). La majorité de ces bandes représentent des protéines codées par le génôme de *E. coli*. Cependant, une bande est plus marquée que les autres dans la fraction soluble de *E. coli* /pV3; elle correspond au poids moléculaire de la L-LDH de muscle de lapin commerciale et est estimée à 35 kDa. Aucune bande importante ne correspond à ce poids moléculaire dans la fraction soluble de *E. coli* /pOTSnco12. Cette bande correspondrait donc à la L-LDH* de muscle de lapin recombinante surexprimée dans la fraction soluble de *E. coli* /pV3. Le taux de surexpression de cette protéine mutante est estimé à 5 %.



Graphe de l'élution des protéines par chromatographie sur tamis moléculaire, avec en abcisse le temps (minute) et en ordonnée la ddp (mV).
Le pic n°1, correspondant à l'élution de la LDH*, a été récolté.

Figure 5.3

Electrophorèse (coloration à l'argent)



1: LDH de muscle de lapin commerciale: 0,3 µg
2: LDH de muscle de lapin commerciale: 1 µg
3: Marqueurs de taille "Low": 1 µg
4: Marqueurs de taille "High": 1 µg
5: Fraction soluble *E. coli* / pOTSnco12: 7 µg
6: Fraction soluble *E. coli* / pV3: 10 µg
7: Fraction soluble *E. coli* / pV3: 7 µg
8: LDH* partiellement purifiée : 1 µg

------- 60 kDa

------- 36 kDa

Figure 5.4

5.4. Purification partielle

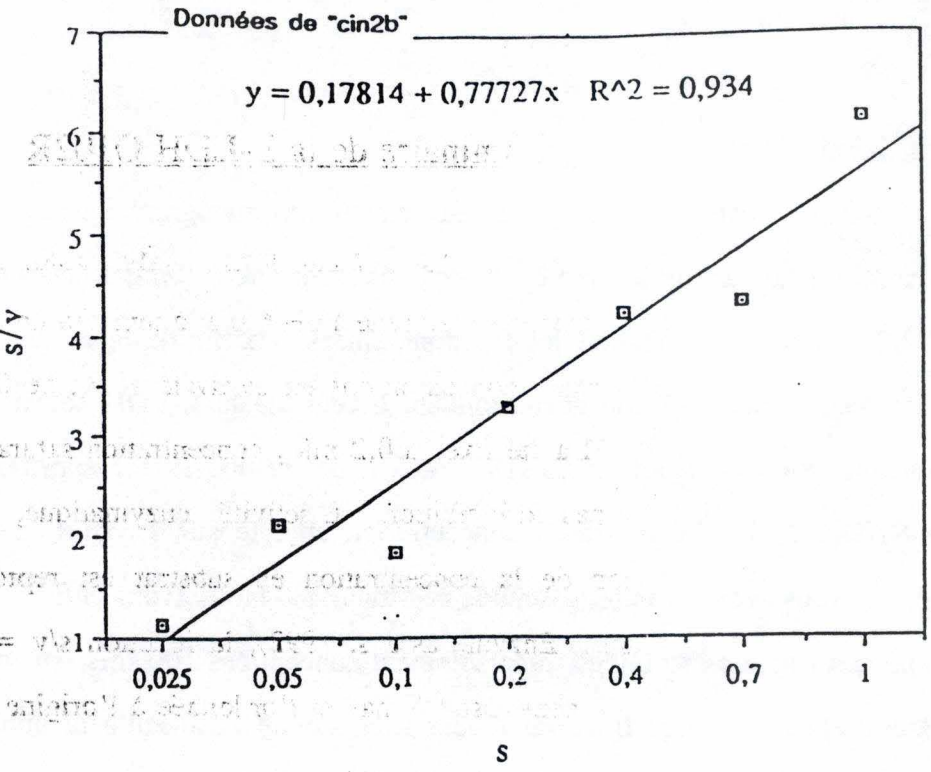
La purification se scinde en deux étapes chromatographiques. Nous avons tout d'abord appliqué la fraction soluble de *E. coli* /pV3 sur une colonne Blue-Sepharose CL-6B (MM 2.2.2). Nous avons récolté les fractions éluées à partir de la minute 54 jusqu'à la minute 76, ces temps d'élution correspondent à ceux de la L-LDH sauvage. La L-LDH s'élue lorsque la concentation en NADH/NaCl a atteint une valeur approximative de 0,1 mM en NADH et 0,5 M en NaCl, concentration atteinte aux environs de la minute 54 (figure 5.2). Nous avons ensuite rassemblé ces fractions. Nous avons enfin chromatographié l'ensemble des fractions récoltées, préalablement concentrées 100 fois, sur une colonne de type tamis moléculaire. Les fractions éluées à la minute 22 jusqu'à la minute 28 ont été conservées (figure 5.3).

5.5. Estimation de la concentration totale en protéine de la fraction partiellement purifiée

La densité optique à 280 nm de la fraction partiellement purifiée, nous permet de calculer la concentration molaire de la L-LDH (MM 2.2.4). Nous avons évalué cette concentration à environ 2,4 10^{-6} molaire.

5.5. Vérification de la purification partielle par électrophorèse

L'analyse par électrophorèse (acrylamide 30 % et bisacrylamide 0,8 %) (figure 5.4) de la fraction partiellement purifiée révèle la présence d'une bande à 35 kDa qui correspond au poids moléculaire du monomère de la L-LDH de muscle de lapin commerciale. La majorité des bandes présentes dans la fraction non purifiée sont absentes de la fraction purifiée. Seuls quelques contaminants mineurs sont détectés. Nous estimons dès lors la pureté à environ 90 %.



Transformation de Hanes pour 7 mesures d'activité de la LDH*, avec en abcisse s (concentration du pyruvate en mM) et en ordonnée s/v (en mM/(U/minute/mg)). Figure 6.1

Tableau 6.1: Estimation des constantes cinétiques de la LDH* de muscle de lapin

pH 6	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Gln102Arg	0,23	9,12	39 10^3

Tableau 6.2: Constantes cinétiques de la LDH non mutante et de la LDH R171F de muscle de lapin (C. Vinals, non publié)

pH 6	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	0,14	1038,8	7420 10^3
Arg 171Phe	66,6	76,56	1,14 10^3

Tableau 6.3: Constantes cinétiques de la LDH de *Bacillus stearothermophilus* (Jones et al., 1992)

Pyruvate	Km (mM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km (M^{-1} s^{-1})
Non mutant	0,04	188	4,8 10^6
Gln102Arg	1,2	2,45	2 10^3

6. Caractérisation cinétique préliminaire de la L-LDH Q102R

6.1. Mesure des constantes cinétiques de la protéine mutante en présence de pyruvate

Nous avons réalisé 7 mesures d'activité à pH 6,0 et à température ambiante dans un tampon citrate 50 mM, pour des concentrations en pyruvate allant de 0,025 mM à 1 mM. La concentration en NADH a été fixée à 0,2 mM, concentration saturante pour la L-LDH sauvage n'impliquant pas d'inhibition. L'activité enzymatique, mesurée par spectrophotométrie, en fonction de la concentration en substrat est représentée par la transformation linéaire de Hanes (Enzyme assays, 1992); la fonction $s/v = (s/Vmax) + Km/Vmax$ est une droite dont la pente est $1/Vmax$ et l'ordonnée à l'origine est $Km/Vmax$ (figure 6.1).

La constante d'affinité du mutant pour le pyruvate (Km) est estimée à 0,23 mM (tableau 6.1). Le Km du mutant est légèrement supérieur à celui du non mutant (tableau 6.2). Ceci confirmerait l'hypothèse selon laquelle la glutamine 102 n'aurait pas un rôle essentiel dans l'affinité de l'enzyme pour le substrat (Jones et al., 1992). Le changement conformationnel de la boucle 102 à 109 est provoqué par la formation du complexe ternaire et c'est seulement après ce changement que la distance entre la glutamine 102 et le groupe méthyle du pyruvate diminue, ce qui permet une interaction entre ces 2 entités.

Le Kcat du mutant est estimé à 9,12 s^{-1} (tableau 6.1). Cette diminution du Kcat correspond à une diminution de 100 fois par rapport à l'enzyme sauvage dont le Kcat est de 1038,8 s^{-1} (tableau 6.2). Le fait que le groupe amide de l'arginine 102 soit énergétiquement défavorable à la stabilisation du complexe de transition (énolpyruvate) serait responsable de cette diminution de Kcat, puisque ce dernier est fonction de l'énergie d'activation nécessaire à la formation de ce complexe de transition..

L'efficience catalytique de la L-LDH mutante est estimée à 39.10^3 M^{-1} s^{-1}. Cette valeur inférieure de 3 ordres de grandeur par rapport à la protéine sauvage (tableau 6.2) signifierait que la modification de ce résidu n'a pas irréversiblement endommagé l'enzyme. Nous pouvons, lors de la comparaison avec les constantes cinétiques de la

littérature (tableau 6.3), remarquer que l'effet sur l'efficience catalytique de la même mutation de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus* (Jones et al., 1992) est approximativement du même ordre de grandeur.

Une mesure d'activité réalisée dans les mêmes conditions que ci-dessus mais avec une concentration en NAD^+ de 0,2 mM et une concentration en D-lactate de 2 mM ne nous a pas permis de mettre en évidence une activité D-lactate déshydrogénase. Jones et ses collaborateurs n'ont pas décelé non plus d'activité D-lactate pour leur mutant.

7. Conclusions et perspectives

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'effet de la mutation Q102R de la L-LDH de muscle de lapin sur la spécificité de cette enzyme. Nous avons, dans un premier temps, muté le résidu glutamine 102 en arginine. Nous avons, ensuite, inséré le gène *LDH* muté dans un vecteur d'expression. La L-LDH mutée a été surproduite et partiellement purifiée. Des résultats cinétiques partiels ont révélé que l'efficience catalytique du mutant semble diminuer de 3 ordres de grandeur par rapport à la protéine sauvage. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus par Jones et ses collaborateurs (1992), concernant la même mutation effectuée sur la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus.* Le rôle de la glutamine 102 semble être conservé dans au moins deux protéines, en l'occurrence la L-LDH de muscle de lapin et la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*, pourtant très éloignées au point de vue évolutif. Ces deux enzymes, proches au niveau de leur séquence et de leur structure, seraient aussi, proches au niveau de leur fonction, notamment au niveau d'un de leur AA, la glutamine 102.

Le fait qu'aucune activité de l'enzyme mutante en présence de D-lactate n'ait été décelée indiquerait que la glutamine 102 n'est pas indispensable à la stéréospécificité de l'enzyme. Cependant, une analyse cinétique plus approfondie de l'enzyme mutante pure est

indispensable. Il s'agira, dans un premier temps, d'optimaliser le protocole de purification et de préciser les valeurs de Kcat et Km en complétant les mesures effectuées sur l'enzyme mutante. Des mesures cinétiques à différentes températures et à différents pH de l'activité de la L-LDH Q102R mèneront à une caractérisation de la thermostabilité et du pH optimum de cette enzyme. De plus, il sera intéressant de tester l'activité de cette protéine mutante avec d'autres substrats que le pyruvate. En particulier, la valeur de l'efficience catalytique de l'enzyme avec l'oxaloacétate permettra de caractériser plus précisément l'enzyme mutante.

La double mutation Q102R et R171F permettra de compléter l'analyse stéréospécifique de l'enzyme. Ceci nous conduira à confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une possible modification de l'affinité de l'enzyme envers les 2 stéréoisomères du lactate induite par ces mutations.

Bibliographie

Abad-Zapatero C.; Griffith J. P.; Sussman J. L.; Rossmann M. G. Refined crystal structure of dogfish M4 apo-lactate dehydrogenase. J. Mol. Biol.; 1987; 198: 445-467

Adams M. J.; Buehner M.; Chandrasekhar K.; Ford G. C.; Hackert M. L.; Liljas A.; Rossmann M. G.; Smiley I. E.; Allison W. S.; Everse J.; Kaplan N. O.; Taylor S. S. Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1973; 70(7): 1968-1972

Benbow RM.; Kaiserman-HB.; Odenwald WF.; Stowers. DJ. A major single-strand DNA binding protein from ovaries of the frog, *Xenopus laevis*, is lactate dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophysic.; 1989; 1008 (1): 23-30.

Bränden C-I. Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes; 1980. Ed. Johnathan Jeffery.

Buehner M.; Hecht H.J. Z. Kristallogr.; 1987; 178: 44.

Bur D.; Clarke T.; Friesen J. D.; Gold M.; Hart K. W.; Holbrook J. J.; Jones J. B.; Luyten M. A.; Wilks H. M. 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.

Chenault, H.K.; Whitesides, G.M. Lactate Dehydrogenase-Catalysed Regeneration of NAD from NADH for Use in Enzyme-Catalysed Synthesis. Bioorg. Chem.; 1989; 17(4): 400-409

Clarke A. R.; Atkinson T.; Holbrook J. J. From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part 1. TIBS; 1989; 14: 101-105.

Clarke A. T.; Atkinson T.; Holbrook J. J. From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II. TIBS; 1989; 14: 145-148.

Clarke A. R.; Colebrook S.; Cortes A.; Emery D. C.; Halsall D. J.; Hart K. W.; Jackson R. M.; Wilks H. M.; Holbrook J. J. Towards the construction of a universal NAD(P)+-dependent dehydrogenase: comparative and evolutionary considerations; 1991.

Clarke A.R.; Smith C.J.; Hart K.W.; Wilks H.M.; Chia W.N.; Lee T.V.; Birktoft J.J.; Banaszak L.J.; Barstow D.A.; Atkinson T.; Holbrook J.J. Rational construction of a 2-hydroxyacid dehydrogenase with new substrate specificity. Biochem. Biophys. Res. Commun.; 1987; 148(1): 15-23;

Clarke A. R.; Waldman A. D. B.; Munro I.; Holbrook J. J. Changes in the state of subunit association of lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochim. Biophys. Acta; 1985; 828: 375-379.

Clarke A.R.; Waldman A.D.B.; Hart K.W.; Holbrook J.J. The rates of defined changes in protein structure during the catalytic cycle of lactate dehydrogenase. Biochim. Biophys Acta; 1985; 829: 397-407

Clarke A.R.; Wigley D.B.; Chia W.N.; Barstow D.; Atkinson T.; Holbrook J.J. Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis. Nature; 1986; 324(18): 699-702

Dretzen G., Ballard M., Sassone-Corsi P., Chambon P. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem.; 1981; 12,295-298.

Dunn C. R.; Wilks H. M.; Halsall D. J.; Atkinson T.; Clarke A. R.; Muirhead H.; Holbrook J. J. Design and synthesis of new enzymes based on the lactate dehydrogenase framework; 1991.

Eventoff W.; Rossmann M.G.; Taylor S.S.; Torff H.J.; Meyer H.; Keil W.; Kiltz H.H. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1977; 74(7): 2677-2681

Feeney R.; Clarke A. R.; Holbrook J. J. A single amino acid substitution in lactate dehydrogenase improves the catalytic efficiency with an alternative coenzyme. Biochem. Biophys. Res. Com.; 1990; 166(2): 667-672

Garvie E.I. Bacterial lactate dehydrogenases. Microbiol. Rev.; 1980; 44(1): 106-139

Grau U. M.; Trommer W. E.; Rossmann M.G. 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

Hart/Conia. Introduction à la chimie organique; 1987. Ed. Interéditions.

Hart K. W.; Clarke A. R.; Wigley D. B.; Chia W. N.; Barstow D. A.; Atkinson T.; Holbrook J. J. The importance of arginine 171 in substrate binding by *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. Biochem. Biophys. Res. Com.; 1987; 146: 346-352

Hendersen P. Enzyme assays. Ed. D. Rickwood and B. D. Hames; 1991.

Hiraoka, B.Y.; Sharief, F.S.; Yang, Y.W.; Li, W.H.; Li, S.S.L. 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.

Ho C.; Rule GS.; Pratt EA.; Simplaceanu V. Nuclear magnetic and molecular genetic studies of the menbrane-bound D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli* . Biochem.; 1987; 23(2): 549-56. 1992

Holbrook. The enzymes. Holbrook J. J.; Liljas A.; Steindel S. J.; Rossmann M. G. Lactate dehydrogenase. 3d ed. NY: Academic Press; 1975; XI: 191-289.

Holbrook J. J.; Ingram V. A. Ionic properties of an essential histidine residue in pig heart lactate dehydrogenase. Biochem. J.; 1973; 131: 729-738.

Holbrook J. J.; Liljas A.; Steindel S. J.; Rossmann M. G. Lactate dehydrogenase. The enzymes. (Boyer P.D. Ed.) Academic Press New York; 1975; XI: 191

Hottinger H; Kochhar S.; Hunziker P.; Leong-Morgenthaler P. Evolutionnary relationship of NAD-dependant D-lactate deshydrogenase: comparaison of primary structure of 2-Hydroxy acid dehydrogenases. Biochem. Biophys.; 1992; 184: 60-66.

Kunkel TA.; Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci.; 1985; 82: 488.

Le Bras G.; Garel J-R. Properties of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus* : a possible different evolutionary origin for the D- and L-lactate dehydrogenases. FEMSLE; 1991; 79: 89-94.

Lewin B. Genes III; 1987. Ed. Jhon Wiley and sons.

Lheninger A. Biochimie; 1985. Ed. Flammarion.

Li S. S. L.; Fitch W. M.; Pan Y. C. E.; Sharief F. S. Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A4 (muscle), B4 (heart), and C4 (testis). J. Biol. Chem.; 1983; 258(11): 7029-7032

Li S.S.L. 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.

Long G. L.; Kaplan N. O. Diphosphopyridine nucleotide-linked D-lactate dehydrogenases from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* and the seaworm, *Nereis virens*. I. Physical and chemical properties. Arch. Biochem. Biophys.; 1973; 154: 696-710.

Long G. L.; Kaplan N. O. Diphosphopyridine nucleotide-linked D-lactate dehydrogenases from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* , and the seaworm, *Nereis virens*. II. Catalytic properties. Arch. Biochem. Biophys.; 1973; 154: 711-725;

Luyten M. A.; Bur D.; Wynn H.; Parris W.; Gold M.; Friesen J. D.; Jones J. B. 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

Luyten M. A.; Gold M.; Friesen J. D.; Jones J. B. On the effects of replacing the carboxylate-binding arginine-171 by hydrophobic tyrosine or tryptophan residues in the L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochem.; 1989; 28: 6605-6610.

Ohta T.; Taguchi H. D-lactate dehydrogenase is a menber of the D-isomer-specific 2-hydroxy acid dehydrogenase family. Biochem. J.; 1991; 266: 12588-12594.

Monsan P. et Durand G. Les enzymes; 1982. Ed. Gauthier-villars.

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.

Piontek, K.; Chakrabarti, P.; Schar, H.P.; Rossmann, M.G.; Zuber, H. Structure Determination and Refinement of Bacillus-Stearothermophilus Lactate Dehydrogenase. Prot. Struct. Functi. Gen.; 1990; 7(1): 74-92.

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

Schlatter D.; Kriech O.; Suter F.; Zuber H. The primary structure of the psychrophilic lactate dehydrogenase from *Bacillus psychrosaccharolyticus*. Biol. Chem. Hoppe-Sleyer; 1987; 368: 1435-1446.

Tenenbrauw-Bayer H.; Levitsky A. The refolding of lactate dehydrogenase subunits and their assembly to the functional tetramer. Arch Biochem. Biophysic; 1976; 445: 261-279

Wilks H.M.; Halsall D.J.; Chia W.N.; Clarke A.R.; Holbrook J.J. Designs for a broad substrate specificity keto acid dehydrogenase. Biochemistry; 1990; 29: 8587-8591.

Wilks H. M.; Hart K. W.; Feeney R.; Dunn C. R.; Muirhead H.; Chia W. N.; Barstow D. A.; Atkinson T.; Clarke A. R.; Holbrook J. J. A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. Science; 1988; 242: 1541-1544;

White J. L.; Hackert M. L.; Buehner M.; Adams M. J.; Ford G. C.; Lentz P. J. Jr; Smiley I. E.; Steindel S. J.; Rossmann M. G. A comparison of the structures of apo dogfish M4 lactate dehydrogenase and its ternary complex. J. Mol. Biol.; 1976; 102: 759-779;

Zhang S.; Yang S.; Cai M.; Liu-J.; Gu Y.; Wang Z. Studies on the thermostable L-lactate dehydrogenase from thermophilic bacteria. Wei-Sheng-Wu-Hsueh-Pao; 1992; 31(6): 438-42.

Zülli F.; Weber H.; Zuber H. Structure and function of L-lactate dehydrogenases from thermophilic and mesophilic bacteria, X. Analysis of structural elements responsible for the differences in thermostability and activation by fructose 1,6-bisphosphate in the lactate dehydrogenases from *B. stearothermophilus* and *B. caldolyticus* by protein engineering. Biol. Chem. Hoppe-Sleyer; 1990; 371: 655-662.