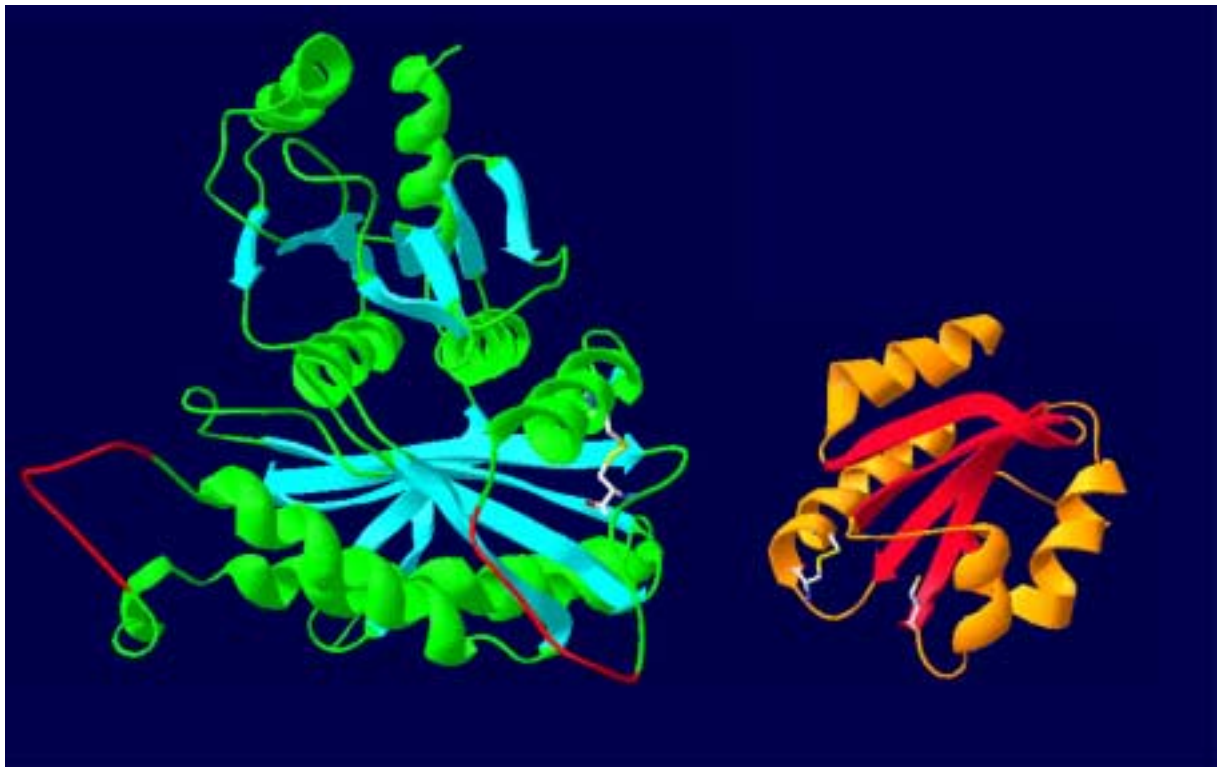


**ETUDES DE LA REGULATION DE LA
FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE PAR LA
THIOREDOXINE F A L'AIDE D'APPROCHES
MOLECULAIRES**



Yves Balmer

Neuchâtel 2001

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Etude de la régulation de la fructose-1,6-
bisphosphatase par la thiorédoxine *f* à l'aide
d'approches moléculaires**

de M. Yves Balmer

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

MM. P. Schürmann (directeur de thèse),
J.-M. Neuhaus et
J.-P. Jacquot (Nancy F)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 1^{er} juin 2001

Le doyen:



J.-P. Derendinger

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier très sincèrement mon directeur de thèse, le Professeur Peter Schürmann, pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer ce travail dans son groupe de recherche, mais également pour sa disponibilité, le soutien qu'il m'a apporté et l'intérêt dont il a fait preuve durant ces quatre années de recherche.

Je remercie également les Professeurs Jean-Marc Neuhaus et Jean-Pierre Jacquot pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie Caroline Wyss, Véronique Vermot et Anne-Lise Stritt-Etter pour leur aide, pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

Mes remerciements s'adressent à tous les membres du laboratoire de Biochimie Végétale, avec une attention particulière pour Greg Del Val, mon prédécesseur, et pour Albert Spielmann, pour leurs conseils.

Je remercie tous mes collègues de biologie et spécialement Thomas Eggmann, Carmela Di Mito et Eric Grueter pour leur amitié et les bons moments passés devant un café.

Enfin, je remercie les deux personnes qui m'ont le plus soutenu durant ces nombreuses années, mes parents. Merci pour tout.

TABLE DES MATIERES

<u>1</u>	<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>5</u>
1.1	LA PHOTOSYNTÈSE	5
1.1.1	RÉACTIONS PHOTOCHEMIQUES.....	6
1.1.2	RÉACTIONS ENZYMATIQUES	6
1.2	COORDINATION DES RÉACTIONS PHOTOCHEMIQUES ET ENZYMATIQUES	7
1.3	LE SYSTÈME FERREDOXINE-THIORÉDOXINE RÉDUCTASE	8
1.4	LES THIORÉDOXINES	9
1.4.1	LES THIORÉDOXINES DU CHLOROPLASTE.....	9
1.4.2	THIORÉDOXINE F	9
1.5	INTERACTIONS DE LA THIORÉDOXINE F ET DE SES ENZYMES-CIBLES.....	10
1.6	LA FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE CHLOROPLASTIQUE	11
<u>2</u>	<u>BUT DU PROJET</u>	<u>13</u>
<u>3</u>	<u>MATERIEL ET METHODES.....</u>	<u>15</u>
3.1	EQUIPEMENTS	15
3.2	BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	15
3.2.1	SOUCHES DE BACTÉRIES	15
3.2.2	PLASMIDES	16
3.2.2.1	Vecteurs de clonage	16
3.2.2.2	Vecteurs d'expressions.....	16
3.2.3	AMORCES (PRIMERS)	16
3.2.4	SOURCES D'ADN MATRICE DISPONIBLES DANS LE LABORATOIRE	17
3.3	MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	17
3.3.1	DIGESTION D'ADN	17
3.3.2	ELUTION DE FRAGMENTS D'ADN.....	17
3.3.3	LIGATION	18
3.3.4	PRÉPARATION D'UN VECTEUR PBLUESCRIPT T-SORTANT	18
3.3.5	TRANSFORMATION	18
3.3.6	PURIFICATION DE PLASMIDES	19
3.3.7	AMPLIFICATION PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	19
3.3.7.1	Conditions d'amplification.....	19
3.3.7.2	Amplification du plasmide entier pour mutagenèse dirigée.....	20
3.3.8	SÉQUENÇAGE	20
3.3.9	MUTAGENÈSE DIRIGÉE	20
3.3.9.1	Méthodes de la double amplifications.....	20
3.3.9.2	Méthode amplifiant le vecteur dans son ensemble.....	21
3.3.10	PHOSPHORYLATION DES PRIMERS.....	22
3.4	MÉTHODES RELATIVES À L'EXPRESSION ET LA PURIFICATION DE PROTÉINES RECOMBINANTES.....	22
3.4.1	MILIEUX DE CULTURE	22
3.4.2	FERMENTEURS.....	22

3.4.3	CONDITIONS DE CULTURE.....	22
3.4.4	CHROMATOGRAPHIE.....	23
3.4.5	SYSTÈME DE CONCENTRATION DE PROTÉINES	23
3.5	PURIFICATION DE LA THIORÉDOXINE F RECOMBINANTE TRX F L C49S/C73S.....	24
3.5.1	LYSE CELLULAIRE	24
3.5.2	ISOLATION DES CORPS D'INCLUSIONS.....	24
3.5.3	SOLUBILISATION	24
3.5.4	RENATURATION.....	24
3.5.5	CHROMATOGRAPHIE.....	25
3.6	PURIFICATION DES TRX F C49S ET C49S/C73S.....	25
3.6.1	CHOC OSMOTIQUE	25
3.6.2	COLONNE SP-SÉPHAROSE	25
3.6.3	TAMISAGE MOLÉCULAIRE G-50F	26
3.6.4	CONCENTRATION AVEC DU POLYÉTHYLÈNE GLYCOL (PEG)	26
3.7	PURIFICATION DE LA FBPASE	26
3.7.1	LYSE CELLULAIRE	26
3.7.2	PRÉCIPITATION ACIDE	26
3.7.3	COLONNE Q-SÉPHAROSE.....	26
3.7.4	HYDROXYAPATITE (ÉTAPE ADDITIONNELLE).....	27
3.7.5	TAMISAGE MOLÉCULAIRE S-200	27
3.8	MÉTHODES RELATIVES À L'ENZYMOLOGIE	27
3.8.1	ELECTROPHORÈSE SUR GEL SDS-PAGE.....	27
3.8.1.1	Coloration des gels SDS.....	28
3.8.2	IMMUNOBLOT.....	28
3.8.2.1	Transfert électrophorétique	28
3.8.2.2	Révélation immunologique du filtre	28
3.8.3	DÉTECTION DES MUTANTS DE TRX F LORS DE LA PURIFICATION.....	29
3.8.4	DÉTERMINATION DU COEFFICIENT D'EXTINCTION MOLAIRE DE LA FBPASE RECOMBINANTE WT.....	29
3.8.5	DICHOÏSME CIRCULAIRE.....	30
3.8.6	TESTS D' ACTIVITÉ.....	30
3.8.6.1	Test discontinu par dosage de phosphates inorganiques.....	30
3.8.6.2	Test cinétique	30
3.8.6.3	Test cinétique standard.....	31
3.8.6.4	Test d'activation de la FBPase.....	32
3.8.7	MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA FBPASE EN FONCTION DU Mg^{2+}	32
3.8.8	DÉTERMINATION DU POTENTIEL D' OXYDORÉDUCTION DE LA FBPASE	32
3.8.9	TITRATION DES THIOLS LIBRES	34
3.8.10	FORMATION D'HÉTÉRODIMÈRES TRX F-FBPASE.....	34
4	RESULTATS ET DISCUSSIONS	35
4.1	PARTIE I: BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	35
4.1.1	CLONAGE DU GÈNE CODANT POUR LA FBPASE CHLOROPLASTIQUE D'ÉPINARD.....	35
4.1.2	MUTAGENÈSE DIRIGÉE	36
4.1.2.1	Thiorédoxine f.....	36
4.1.2.2	Fructose-1,6-bisphosphatase	37
4.1.2.3	Résumé	37
4.1.2.4	Remarques sur la mutagenèse dirigée	38

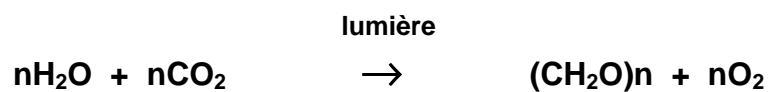
5	<u>RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>	39
5.1	PARTIE II: EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES	39
5.1.1	THIORÉDOXINE F (FORME COURTE)	39
5.1.2	THIORÉDOXINE F L (FORME LONGUE)	40
5.1.3	FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE	41
6	<u>RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>	42
6.1	PARTIE III: COMPARAISON DE LA FBPASE WT NATIVE ET RECOMBINANTE	42
6.1.1	SÉPARATION SUR GEL SDS	42
6.1.2	CINÉTIQUE D'ACTIVATION PAR LA TRX F	42
6.1.3	ANALYSE DE LA FBPASE RECOMBINANTE PAR TAMISAGE SUR SUPEROSE 12	43
6.1.4	DÉTERMINATION DU COEFFICIENT D'EXTINCTION MOLLAIRE DE LA FBPASE WT	44
6.1.5	DÉTERMINATION DU POTENTIEL D'OXYDORÉDUCTION DE LA FBPASE WT	46
6.1.6	RÉSUMÉ	47
7	<u>RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>	48
7.1	PARTIE IV: CARACTERISATION DES FBPASES RECOMBINANTES WT ET MUTANTES	48
7.1.1	CINÉTIQUES D'ACTIVATION	48
7.1.1.1	FBPase WT	48
7.1.1.2	FBPase C179S	48
7.1.1.3	FBPase C155S	49
7.1.1.4	FBPase C174S	49
7.1.2	ACTIVITÉ EN FONCTION DU MAGNÉSIUM	51
7.1.3	DOSAGE DES GROUPEMENTS THIOLS LIBRES	54
7.1.4	DICHOÏSME CIRCULAIRE	54
7.1.5	DÉTERMINATION DU POTENTIEL D'OXYDORÉDUCTION DE LA FBPASE C179S	56
7.1.6	DISCUSSION	56
7.1.6.1	FBPase WT	56
7.1.6.2	Mutation de la Cys179	57
7.1.6.3	Mutation de la Cys155	58
7.1.6.4	Mutation de la Cys174	58
8	<u>RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>	60
8.1	PARTIE V: FORMATION D'HÉTÉRODIMÈRES STABLES ENTRE LA FBPASE ET LA TRX F	60
8.1.1	FORMATION DE L'HÉTÉRODIMÈRE SANS ADDITION D'OXYDANTS	60
8.1.2	FORMATION D'HÉTÉRODIMÈRE EN PRÉSENCE D'OXYDANTS	62
8.1.2.1	Addition de diamide	62
8.1.2.2	Addition de Cu ²⁺	63
8.1.2.3	Comportement des FBPases en présence de Cu ²⁺	64
8.1.3	RÉDUCTION DES COMPLEXES TRX F-FBPASE	65
8.1.4	FORMATION D'HÉTÉRODIMÈRES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE TRX F	66

8.1.5	SÉPARATION SUR FPLC DU COMPLEXE TRX F-FBPASE	67
8.1.6	FORMATION DE COMPLEXES ENTRE LA TRX F ET DES PROTÉINES CHLOROPLASTIQUES..	69
8.1.7	DISCUSSION.....	71
9	<u>CONCLUSION.....</u>	74
10	<u>REFERENCES</u>	77
11	<u>ANNEXE 1: EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA TRX F C49S #4.....</u>	82
12	<u>ANNEXE 2: EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA FBPASE WT #5.....</u>	86

1 INTRODUCTION

1.1 La photosynthèse

Jason Priestley, chimiste anglais de la fin du dix-huitième siècle, fut l'un des premiers à démontrer la capacité d'une plante à régénérer l'oxygène en enfermant dans un récipient scellé une plante et une bougie (ou une souris). Depuis lors de nombreux chercheurs ont contribué à la compréhension de plus en plus détaillée de ce processus appelé photosynthèse qui se traduit par une simple équation:



Cette réaction photosynthétique permet à la vie terrestre d'accéder à une source inépuisable d'énergie, l'énergie solaire en la transformant en énergie chimique sous forme de glucide. La lumière est utilisée par les organismes photosynthétiques pour former du saccharose et de l'amidon à partir de gaz carbonique et d'eau. La photosynthèse est donc doublement nécessaire. D'une part elle produit une énorme quantité d'énergie disponible, qui correspond à l'assimilation de 10^{10} tonnes de CO_2 par année sous forme de composés organiques, et de l'autre elle régénère l'oxygène atmosphérique.

Chez les plantes cette réaction s'effectue dans les chloroplastes, ces organites intracellulaires vraisemblablement descendant de bactéries photosynthétiques incluses par endocytose dans des cellules eucaryotes primitives, et est séparée en une phase photochimique, où la lumière est captée et transformée en énergie chimique, et une phase enzymatique où l'énergie chimique de la première phase est stockée sous forme de glucides (Fig. 01).

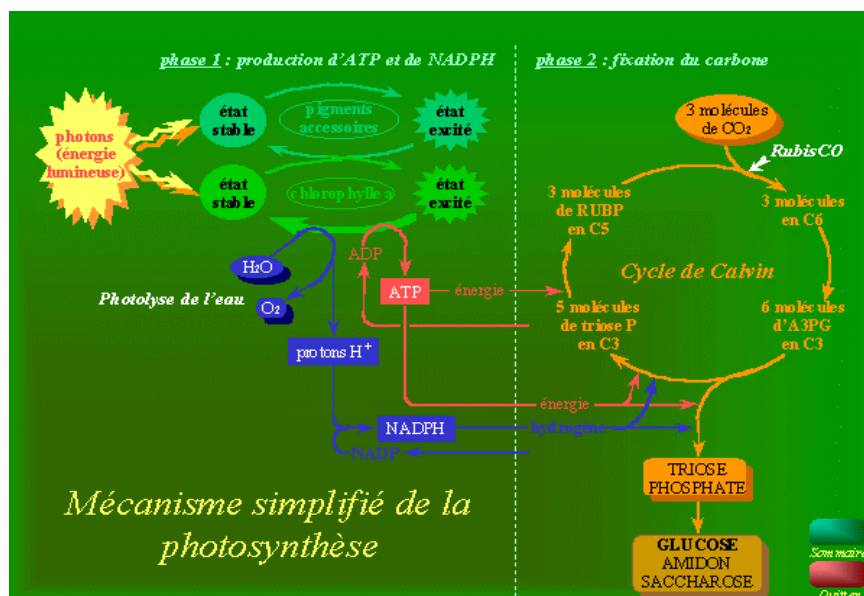


Figure 01.

Schéma de la photosynthèse présentant la phase photochimique (1) et enzymatique (2).

1.1.1 Réactions photochimiques

Ces réactions, également appelées réactions photosynthétiques de transfert d'électrons (ou réactions lumineuses), interviennent au niveau de la membrane thylacoïde des chloroplastes. La première étape de la photosynthèse est l'absorption d'un photon par une molécule de chlorophylle ce qui va provoquer un état d'excitation électronique qui est dirigé vers un complexe réactionnel. Dans ce centre de réaction, l'énergie de l'électron excité est transformée en une séparation de charge. Deux photosystèmes reliés entre eux par une chaîne de transporteurs assurent la formation de ce potentiel réducteur. Le photosystème I génère la formation de NADPH et le photosystème II transfère les électrons de l'eau à une quinone en libérant de l'oxygène (Fig. 02). Le transfert des électrons le long de la chaîne photosynthétique permet la création d'un gradient de protons transmembranaire utilisé pour former de l'ATP.

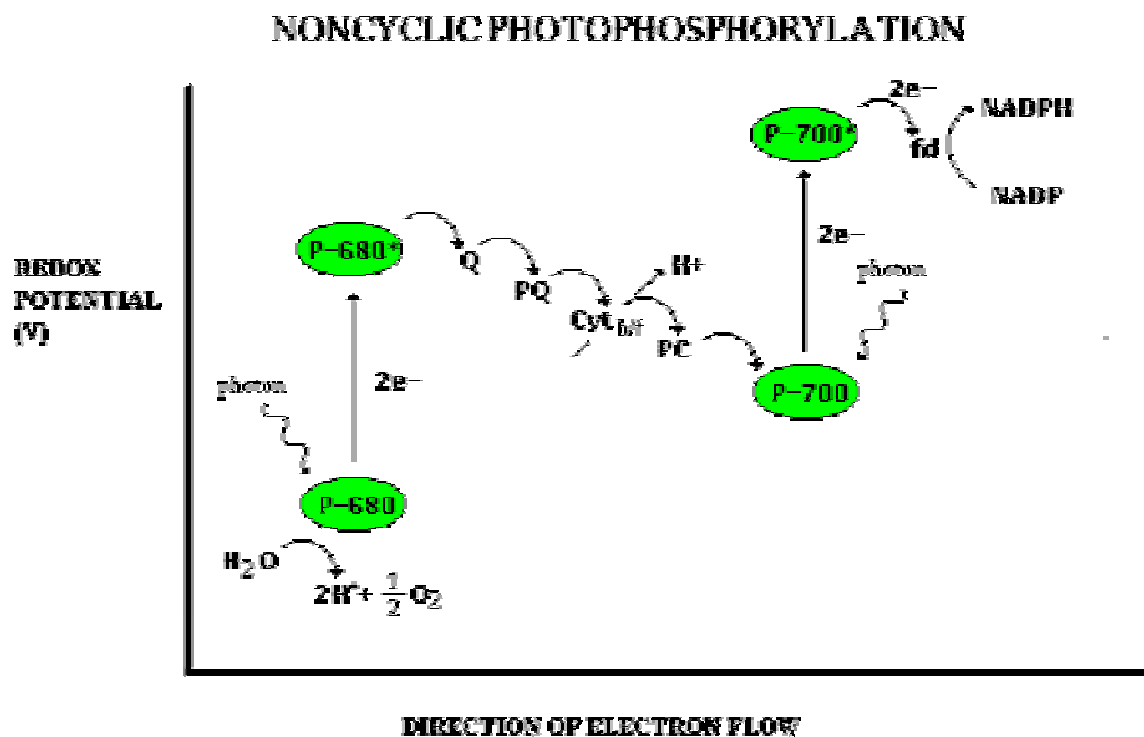


Figure 02. Schéma de la chaîne de transporteurs d'électrons de la photosynthèse.

1.1.2 Réactions enzymatiques

Plus connues sous le nom de cycle de Calvin-Benson, ces réactions ont lieu dans le stroma du chloroplaste et utilisent l'énergie produite par les réactions lumineuses afin d'assimiler le CO₂ atmosphérique en le transformant en glucide. La fixation du CO₂ est réalisée par la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase qui va catalyser à partir d'une molécule de ribulose-1,5-bisphosphate et une de CO₂ la formation de deux 3-phosphoglycérates. Les nombreuses réactions enzymatiques qui surviennent ensuite permettent la formation d'hexoses qui seront stockés sous forme d'amidon, mais également la régénération de l'accepteur de CO₂ (Fig. 03).

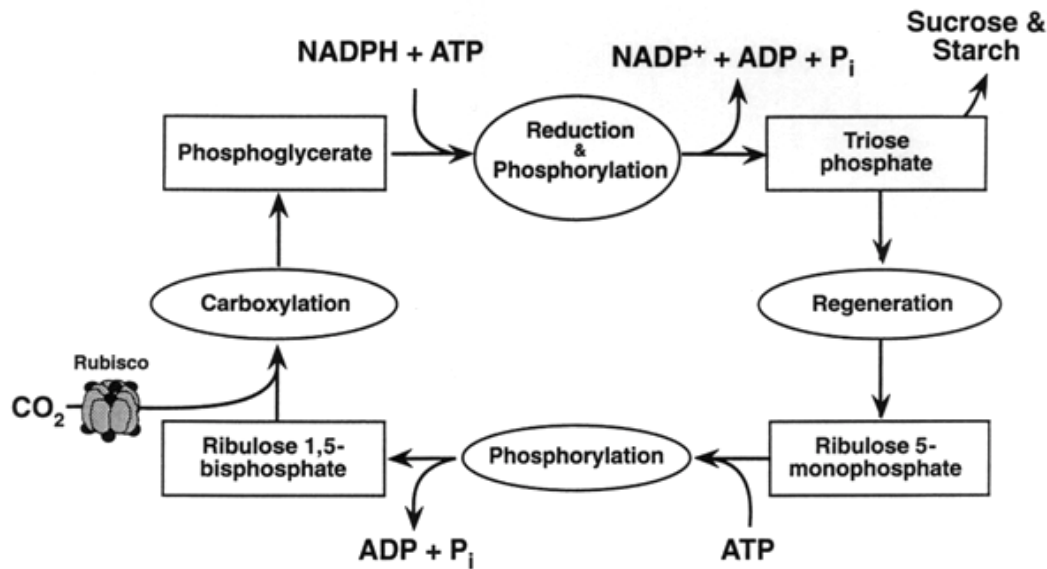


Figure 03. Diagramme simplifié du cycle de Calvin-Benson.

L'équation finale du cycle de Calvin pour former un hexose est:



Le processus d'assimilation du gaz carbonique nécessite de grande quantité d'énergie sous forme d'ATP et de NADPH, ces deux molécules étant fournies par les réactions lumineuses de la photosynthèse.

1.2 Coordination des réactions photochimiques et enzymatiques

Le cycle de Calvin est dépendant de l'énergie fournie par les réactions photosynthétiques de transfert d'électrons. Il existe un système de régulation activant certaines enzymes-clé de l'assimilation du CO_2 lorsque de la lumière est captée par les photosystèmes.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce processus de régulation. Le transfert des électrons le long de la chaîne photosynthétique provoque une concentration de protons dans le lumen des thylacoïdes, ce qui élève le pH qui passe de 7 à 8 dans le stroma des chloroplastes. Ce flux de protons est contrebalancé par un flux inverse de de ions Mg^{2+} (Portis & Heldt, 1976) vers le stroma, correspondant à une élévation de la concentration de Mg^{2+} de 1 à 5 mM. Ce changement de la composition du milieu stromatique est favorable à l'activité de nombreuses enzymes du cycle de Calvin qui fonctionnent mieux à un pH de 8.0 et qui nécessitent du magnésium pour leurs activités catalytiques.

Cependant l'activation de nombreuses enzymes impliquées dans le cycle de Calvin est achevée par réduction de ponts disulfures via le système ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) qui reçoit les électrons directement du flux photosynthétique (Fig. 04) (Schürmann & Buchanan, 2001).

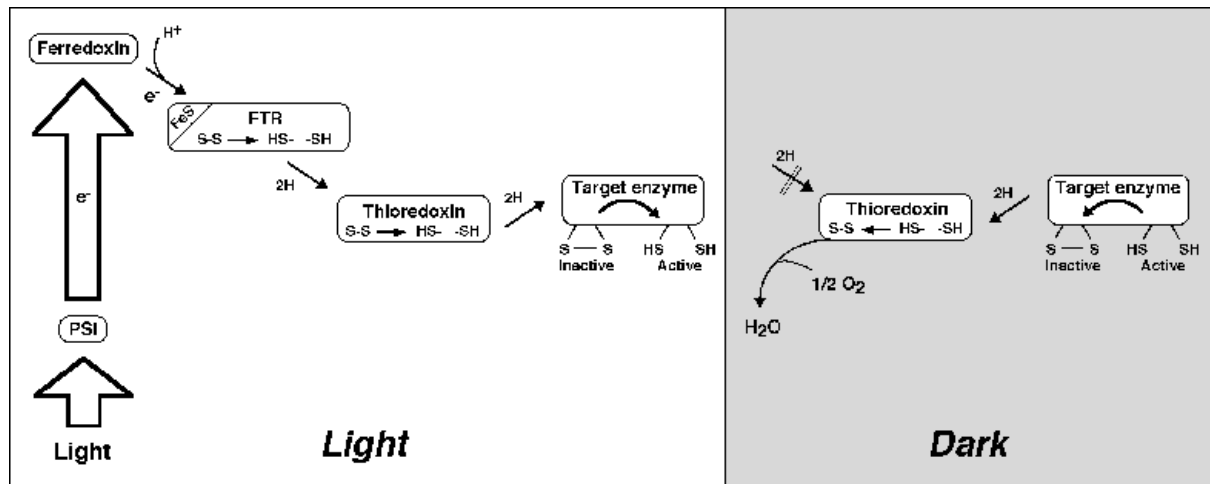
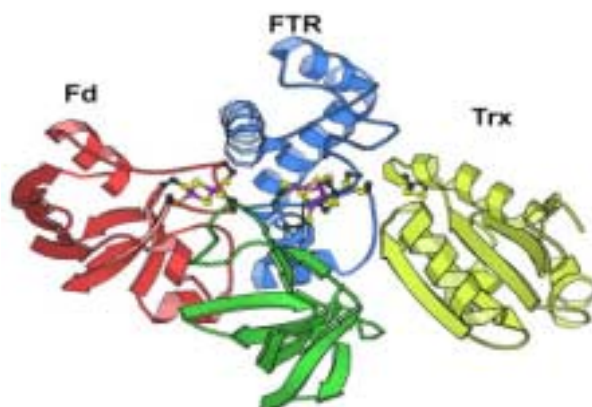


Figure 04. Diagramme représentant l'activation des enzymes du cycle de Calvin en présence de lumière et leur inactivation à l'obscurité (Schürmann et Buchanan, 2001).

1.3 Le système ferrédoxine-thiorédoxine réductase

Le flux des électrons activés par les photosystèmes aboutit à la ferrédoxine qui est une protéine de 12 kDa soluble contenant un centre 2Fe-2S. La ferrédoxine transfère son électron à la ferrédoxine-NADP⁺ réductase ce qui va aboutir à la formation de NADPH. Une partie du flux d'électrons peut être dévié vers la nitrite réductase, la glutamate synthase ou la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) (Knaff, 1996). La FTR est une protéine importante du mécanisme de régulation de l'assimilation du CO₂ car elle a la capacité de transformer un transfert à un électron en un signal à deux électrons nécessaire pour réduire une liaison disulfure. La FTR contient un centre 4Fe-4S ainsi qu'un pont disulfure et est composée de deux sous-unités dissemblables: une sous-unité catalytique de taille constante aux environs de 13 kDa, bien conservée du point de vue de la séquence primaire, entre les différents organismes photosynthétiques et une sous-unité variable d'une taille comprise entre 8 et 13 kDa (Buchanan et al., 1994).

La structure de la FTR de *Synechocystis* a récemment été résolue (Dai et al., 2000). La conformation de cette FTR, qui se présente sous la forme d'un disque, est idéale pour sa fonction. En effet le site de fixation de la ferrédoxine se trouve sur l'une des



faces de la FTR alors que l'autre fixe la thiorédoxine. Cet arrangement linéaire permet la fixation de la première Fd qui transfère son électron à la FTR, puis son remplacement par une deuxième Fd qui apporte le deuxième électron nécessaire à la réduction de la Trx sans gêner l'interaction de cette dernière avec la FTR. La thiorédoxine réduite est relâchée et va pouvoir à son tour réduire ses enzymes-cibles.

Figure 05. Arrangement linéaire du système ferrédoxine-thiorédoxine réductase.

1.4 Les thiorédoxines

Les thiorédoxines sont de petites protéines globulaires d'un poids moléculaire d'environ 12 kDa largement répandues dans les cellules vivantes. La thiorédoxine d'*E.coli* fut la première découverte en 1964 (Laurent et al., 1964) et sa fonction fut décrite comme étant un donneur d'hydrogène pour la ribonucléotide réductase, une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN. La comparaison des différentes séquences connues de Trx montre un site actif conservé comprenant les acides aminés suivants -Trp-**Cys**-Gly-Pro-**Cys**- (parfois -WCPPC-), les deux cystéines formant la liaison disulfure intramoléculaire. La structure secondaire des différentes thiorédoxines est remarquablement stable avec 1 feuillet β à 5 brins formant le cœur de la protéine entouré de 4 hélices α , le tout formant une structure sphérique (Martin, 1995). La réduction du pont disulfure se fait via la FTR dans les chloroplastes, alors que dans les autres compartiments cellulaires les électrons sont fournis par la NADP-thiorédoxine réductase. Les thiorédoxines ont de nombreux rôles de régulation dans le cycle de Calvin, dans le métabolisme du soufre, dans la réplication de l'ADN, dans les réactions aux stress, dans la germination des graines et bien d'autres processus auxquels viennent continuellement s'ajouter de nouvelles fonctions (Buchanan et al., 1994).

Les plantes possèdent trois types de thiorédoxines. La thiorédoxine h (h pour hétérotrophe) a été détectée en premier dans les cellules de la racine, mais elle se trouve dans toutes les compartiments cytosoliques des cellules végétales. Ses fonctions ne sont toujours pas clairement définies, mais il semble qu'elle est impliquée dans la germination des graines (Lozano et al., 1996), dans le mécanisme de détoxification de l' H_2O_2 ainsi que comme messenger potentiel (Schürmann & Jacquot, 2000).

Le chloroplaste contient deux types de thiorédoxines, la Trx m (m pour malate déshydrogénase) et la Trx f (f pour fructose-1,6-bisphosphatase).

1.4.1 Les thiorédoxines du chloroplaste

Les deux thiorédoxines chloroplastiques sont réduites par le système ferrédoxine-thiorédoxine réductase. Les résultats obtenus *in vitro* tendent à montrer une sélectivité dans l'interaction de ces deux Trx avec les enzymes-cibles. La Trx f semble plus apte à activer les enzymes permettant l'assimilation du CO_2 alors que la Trx m serait plus impliquée dans la régulation de la voie oxydative des pentoses phosphates. Bien que la Trx m tienne son nom de sa capacité à activer la malate déshydrogénase, de récentes expériences montrent que la Trx f active la MDH plus efficacement (Hodges et al., 1994; Geck et al., 1996).

1.4.2 Thiorédoxine f

La thiorédoxine f est typiquement chloroplastique, mais est codée par le noyau cellulaire. La comparaison des séquences primaires connues permet de mettre en évidence une troisième cystéine strictement conservée (Cys73 chez l'épinard) et un site actif typique des thiorédoxines (-Trp-Cys₄₆-Gly-Pro-Cys₄₉- chez l'épinard). Une

seule cystéine du dithiol, celle du côté N-terminal, est accessible et permet l'attaque nucléophile du pont disulfure de l'enzyme-cible (Brandes et al., 1993; Capitani et al., 2000).

L'homologie de séquences entre les Trx f et m n'est que de 30 %, cependant les structures secondaires et tertiaires restent très similaires. La résolution de la structure tridimensionnelle des Trx f et m d'épinard permet de comparer plus précisément ces deux protéines au niveau de leurs surfaces (Fig. 06). Si les structures dans leur globalité sont semblables, des différences au niveau de la composition des surfaces sont visibles. La zone principalement hydrophobe proche du site actif, typique des Trx, est présente dans les deux protéines, mais la répartition des charges entourant cette zone est relativement différente ce qui permet d'expliquer la sélectivité propre aux deux thiorédoxines (Capitani et al., 2000).

La troisième cystéine de la Trx f est également exposée en surface de la protéine et bien que son rôle ne soit pas encore élucidé, des expériences *in vitro* ont permis de démontrer qu'elle est capable de former un hétérodisulfure formant un homodimère de Trx f et que sa mutation entraîne une diminution de la capacité de la Trx f à activer la FBPase (del Val et al., 1993).

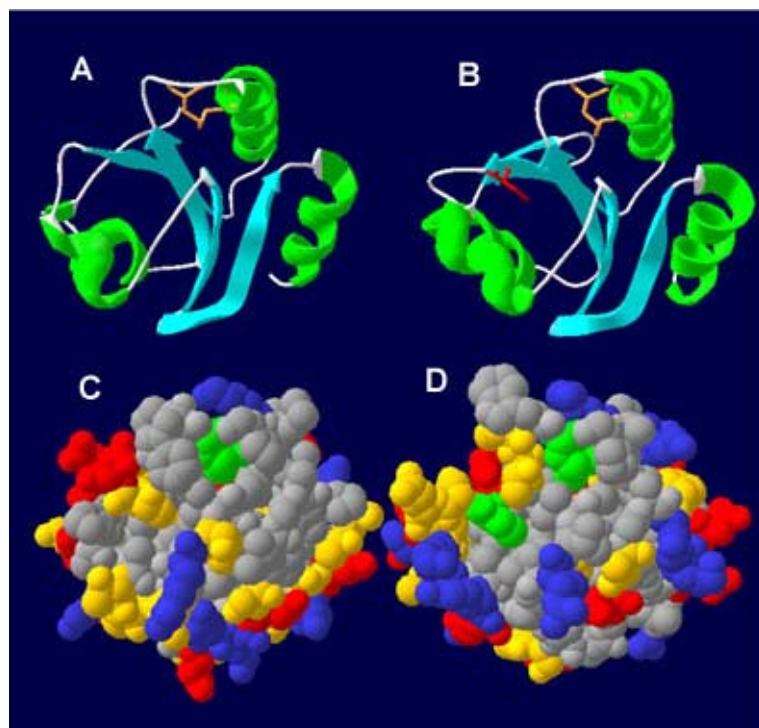


Figure 06. Comparaison de la structure de la Trx m et f.

La structure secondaire et tertiaire de la Trx m (A) et f (B) est semblable à l'exception de la 3^{ème} Cys de la Trx f (en rouge).

C et D, vue de la distribution des chaînes latérales en surface de la Trx m (C) et f (D). Les Cys sont en vert, les résidus hydrophobes en gris, polaires en jaune, chargés positivement en bleu, négativement en rouge.

1.5 Interactions de la thiorédoxine f et de ses enzymes-cibles

La Trx f régule l'activité de trois importantes enzymes du cycle de Calvin-Benson, la fructose-1,6-bisphosphatase, la sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (Breazeale et al., 1978) et la phosphoribulokinase (Porter et al., 1986). Ces trois protéines sont impliquées dans les réactions de régénération du ribulose-1,5-bisphosphate. D'autres enzymes sont également régulées par la Trx f tel que l'ATP synthase

(Schwarz et al., 1997), la NADP-malate déshydrogénase ou encore la rubisco activase (Zhang & Portis Jr, 1999).

Le mécanisme de réduction du pont disulfure de l'enzyme cible par la Trx f réduite procède via la formation d'un hétérodisulfure transitoire formé par la cystéine attaquante du site actif de la Trx f et une des deux cystéines impliquées dans le pont de la cible. Dans un second temps, le deuxième électron de la Trx f est transféré via cette liaison ce qui provoque le clivage de l'hétérodisulfure et la séparation de la protéine-cible réduite et de la Trx f oxydée. Le site, ainsi que le mécanisme, d'activation de la phosphoribulokinase ont déjà été décrits (Brandes et al., 1996). C'est la seule protéine connue où une des cystéines formant le pont de régulation est également impliquée dans l'activité catalytique. L'activation de la NADP-malate déshydrogénase, également très étudiée, est plus complexe et nécessite la réduction de deux (voire trois) ponts disulfures (Ruelland & Miginiac-Maslow, 1999). L'activation de la fructose-1,6-bisphosphatase n'est pas encore complètement élucidée, mais implique vraisemblablement la réduction d'un seul pont disulfure.

1.6 La fructose-1,6-bisphosphatase chloroplastique

La FBPase est un homotétramère d'environ 160 kDa catalysant le clivage du fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate + P_i, une des étapes de la régénération du ribulose-1,5-bisphosphate. Dans les cellules de plantes, il existe deux isoformes codées par le noyau, l'une se trouvant dans le cytosol et l'autre dans le stroma des chloroplastes. Seule la FBPase chloroplastique est activée par réduction (Schürmann & Wolosiuk, 1978; Buchanan, 1980), alors que la régulation de la forme cytosolique est dépendante de l'AMP (Ke et al., 1989; Villeret et al., 1995a; Choe et al., 2000).

La comparaison des structures primaires des différentes FBPases connues révèle la présence d'une insertion d'une quinzaine d'acides aminés contenant trois cystéines dans les séquences de protéines chloroplastiques et c'est au niveau de ces quelques acides aminés que la régulation opère (Marcus et al., 1988) (Fig. 07).

Sugar beet	CGVSI G TIFGIY M VKD.....LNNATLD.....DVL Q PGKNMVAAGY
Spinach	CGVSI G TIFGIY M VKD.....FETATLE.....DVL Q PGKNMVAAGY
Potato	CGVSI G TIFGIY M IKD.....GHEPTLD.....DVL Q PGMNLAAAGY
Rape	CGVSI G TIFGIY T MEH.....SDEPTTK.....DVL K PGNEMVAAGY
Arabidopsis	AAVSTGSIFGIYSPNDE C IVD..DSDDISALGSE E QRCIVNVC Q PGNLLAAGY
Rape	AAVSTGSIFGIYSPNDE C L.P..DSDDISALGSE E ERCIVNVC Q PGNLLAAGY
Spinach	AAVSTGSIFGIYSPNDE C IVD.SDHDD E SQLSAE E QRCV V NVC Q PGD N LLAAGY
Pea	AAVSTGSIFGIYSPNDE C LPDFGDDSD D N T L G T E QRCIVNVC Q PGSNLLAAGY
Soybean	AA A STGSN F W I YSPNDE C LADI...DD D PTLD T T E QRCIVNVC Q PGSNLLAAGY
Wheat	AAVSTGSIFGIYSP S DE C HI.....GDDATLDEVT Q M C IVNVC Q PGSNLLAAGY
Consensus*.....**.....*.....** ..****

Figure 07. Alignement de séquences de FBPases cytosoliques (noir) et chloroplastiques (vert) montrant l'insertion permettant la régulation redox. Les trois cystéines sont en jaune.

Le fragment de séquence présenté dans cette figure comprend les acides aminés 138 à 190 pour la FBPase chloroplastique d'épinard.

Une structure obtenue avec la FBPase d'épinard (Villeret et al., 1995b) n'a pas montré de ponts disulfures, mais a mis en évidence que cette insertion formait une boucle flexible exposée au solvant.

Les premières hypothèses, faites principalement par homologie, situaient le pont disulfure entre la Cys174 et Cys179 de la FBPase d'épinard, mais des études par mutagenèse dirigée effectuées sur la protéine de pois ont démontré le rôle central de la Cys153 (155 pour l'épinard) dans la régulation (Jacquot et al., 1997). Il a fallu la résolution de la structure de la FBPase chloroplastique de pois en 1999 (Chiadmi et al., 1999) pour mettre clairement en évidence un pont disulfure entre la Cys153 et 173 (155 et 174 pour l'épinard) (Fig. 08). La structure permet également aux auteurs de proposer un mécanisme de régulation. La réduction du pont disulfure provoque un relâchement de la structure qui permet le déplacement de deux feuillets β (β_1 et β_2) qui bloquent le site catalytique à 20 Å du site de régulation.

La réduction de la FBPase par la thiorédoxine f n'est pas le seul facteur influençant l'activité de cette phosphatase, des facteurs liés au processus photosynthétique tels que l'augmentation du pH et de la concentration de Mg^{2+} dans le stroma sont à même de moduler cette activité. Il est démontré qu'il est possible d'activer, in vitro, une FBPase oxydée avec une concentration élevée de magnésium et en augmentant le pH au dessus de 8.0 (Zimmermann et al., 1976; Gardemann et al., 1986; Ballicora & Wolosiuk, 1990).

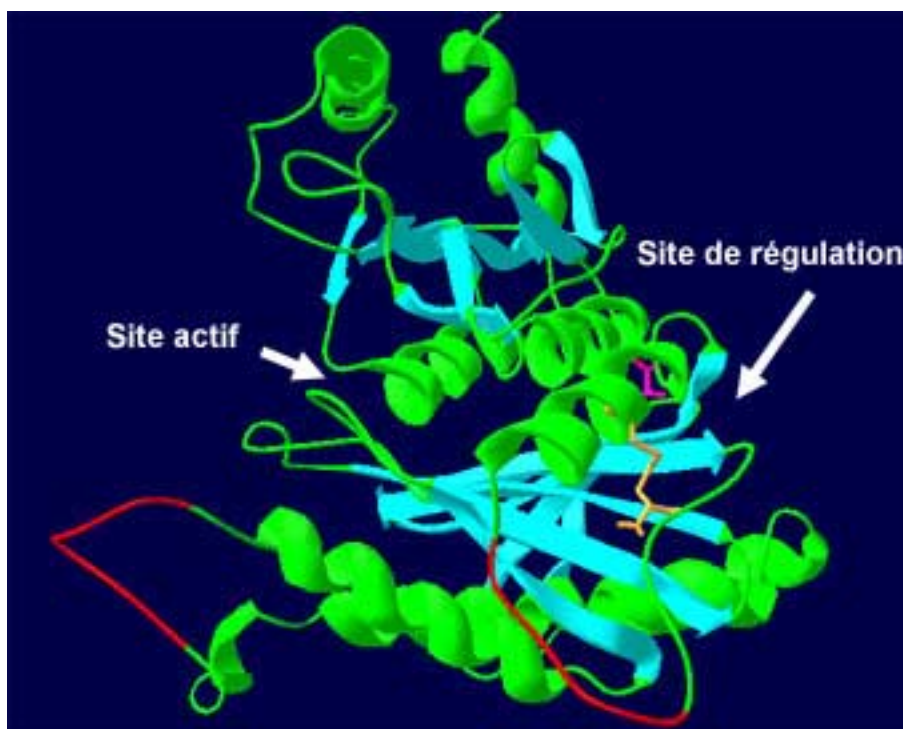


Figure 08. Structure d'un monomère de FBPase chloroplastique avec la zone de régulation (les Cys formant le pont disulfure sont en orange, la troisième Cys en violet) et le site catalytique. (Modèle de la FBPase d'épinard établi en se basant sur la structure de la FBPase de pois, les zones rouges représentent les structures mal définies).

2 BUT DU PROJET

Le but de ce travail est d'étudier l'interaction entre la thiorédoxine f et la fructose-1,6-bisphosphatase chloroplastique d'épinard, plus précisément de se pencher sur le processus de l'activation de la FBPase au niveau macromoléculaire. La voie choisie est celle de la mutagenèse dirigée qui permet de remplacer les cystéines susceptibles de jouer un rôle dans la réaction d'oxydoréduction par des sérines, puis de caractériser les différents mutants obtenus. Ces mêmes mutants sont utilisés afin de stabiliser l'hétérodisulfure transitoire entre la Trx f et la FBPase et d'obtenir un complexe covalent formé de ces deux protéines, le but final de ce travail de thèse étant d'isoler un hétérodimère Trx f-FBPase stable et homogène pour le cristalliser et tenter de résoudre sa structure tri-dimensionnelle. Les données fournies par une telle structure seraient précieuses pour mieux appréhender les phénomènes de reconnaissance et d'orientation des deux protéines (docking).

Ce projet a nécessité de nombreuses étapes:

- L'isolation, le clonage et l'expression du gène codant pour la FBPase chloroplastique mature d'épinard, dans le but de travailler dans un système homologue avec la Trx f et la FBPase issues du même organisme (épinard). La sur-expression de gènes dans un système bactérien permet généralement de produire des quantités élevées de protéines recombinantes et de facilement remplacer des acides aminés précis par mutagenèse dirigée.
- Le remplacement des Cys49 et 73 de la Trx f par des sérines grâce à la mutagenèse dirigée par PCR. La mutation de la Cys49 rend la Trx f inactive, mais laisse libre la Cys46 qui est la cystéine du site actif exposée en surface et qui est responsable de l'attaque nucléophile lors de la réaction d'interconversion thiols-disulfide. La Cys73 ne semble pas directement impliquée dans ce processus, mais elle est également en surface et peut interagir avec d'autres résidus cystéinyles voire des disulfides. Dans le but d'éviter des interactions parasites dues à cette troisième cystéine, elle est également mutée. Trois Trx f sont donc disponibles, la Trx f WT, la Trx f C49S et la Trx f C49/73S.
- Le remplacement des trois cystéines de l'insertion formant la zone de la régulation redox de la FBPase par des sérines. Ces trois cystéines (Cys155, 174 et 179) ont été mutées une par une, produisant trois simples mutants (FBPase C155S, C174S et C179S), et deux par deux ce qui donne trois FBPases ne conservant qu'une seule des cystéines de la zone de régulation.
- L'expression et la purification des mutants. Les mutations ayant tendance à rendre ces protéines moins stables que les protéines recombinantes natives, il est parfois nécessaire d'adapter les protocoles de purification établis pour les formes WT.
- La caractérisation des protéines mutantes. Ces expériences permettent d'établir l'impact que les différentes mutations produisent sur les protéines. Des mutations

similaires ont été réalisées sur la FBPase chloroplastique de pois (Jacquot et al., 1997) ce qui permet de faire des comparaisons.

- L'établissement d'une procédure aboutissant à la formation d'hétérodimères Trx f-FBPase. Plusieurs facteurs tels que le pH, l'équilibre redox du milieu jouent un rôle dans l'interaction entre deux protéines, il faut déterminer les conditions les plus favorables. Des expériences similaires de formation de complexes covalents entre la Trx et la phosphoribulokinase (Brandes et al., 1996), la thiorédoxine réductase (Wang et al., 1996) et la NADP-malate déshydrogénase (Goyer et al., 1999) ont donné des résultats intéressants.
- L'isolation d'une forme homogène d'hétérodimère. La FBPase étant un homotétramère, plusieurs cas de figure peuvent se présenter. Le complexe sera-t-il formé d'une FBPase et de quatre Trx f, ou moins, ou un mélange.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Equipements

Compagnies	Equipements
Beckman	Centrifugeuse CS-6R, Ultracentrifugeuse XL-80
Bioengineering	Fermenteur L1523
Biorad	Minigel MiniProtean II, Gel Doc 1000, appareil de micro filtration bio-dot
Dupont	Centrifugeuses RC-5B Plus, RC-5B, RMC 14
Eppendorf	Centrifugeuse 5417C
Fedegari	Autoclave Technoclav 50
Infors	Aquatron HT
Jasco	Spectropolarimètre J-710
LKB	Collecteur 7000 Ultrorac, Cellules UV 2238 Uvicord SII, 8300 Uvicord II
Metrohm	pH-mètre 691, 744
Mettler	Balances AC 100, P 1200
Millipore	Eau Milli Ro plus, Milli Q plus
Miostar	Micro-onde DMR-703
Mitsubishi	Processeur photo vidéo P68E
MJ research	Thermocycle PTC-100
MWG-Biotech	Séquenceur LiCor 4000L
New Brunswick Scientific	Fermenteur Multigen
Perkin Elmer	Spectrophotomètre Lambda 17, Thermocycle Cetus
Pharmacia	Minigels Phastsystem, Spectrophotomètre Ultrospec 3000, FPLC, Collecteur Frac-300
Savant	Speed Vac Concentrator
Sartorius	Appareil de transfert semi-sec Sartoblot II

3.2 Biologie moléculaire

3.2.1 souches de bactéries

- Souche *E.coli* XL1-Blue-recA⁻ (recA1, lac⁻, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, [F', proAB, lac/q, LacZΔM15, Tn10] (tet^r)).
- Souche *E.coli* BN103 Delta (lacIc^{92yA}) v169, proA⁺, lon⁻, arwD139, strA, thi, hflA150, [chr::Tn10], (strept^r, tetr).
- Souche *E.coli* BL21 DE3 pLysS (E. coli B F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal (DE3) [pLysS Camr]a).

3.2.2 Plasmides

3.2.2.1 Vecteurs de clonage

- pBluescript II KS+ (amp^r) de Stratagène est un vecteur de 2961bp dérivé du pUC 19. Il est utilisé avec la souche XL1-Blue pour toutes les manipulations de clonage et de séquençage.

3.2.2.2 Vecteurs d'expressions

- pKK233-2 MTTL (amp^r et tet^r) est utilisé avec la souche BN103.
- pET-3d (amp^r) est utilisé avec la souche BL21 DE3 pLysS.

3.2.3 Amorces (primers)

Toutes les amorces ont été synthétisées par Microsynth (Balgach, Suisse) à l'exception des primers propres aux vecteurs utilisés.

Primers spécifiques aux vecteurs

Vecteur pET 3d

T7 promoteur

5'-ttaatacgactcactataggg-3'

T7 terminateur

5'-cgatcaataacgagtcgcc-3'

pBluescript II KS+

M13 Reverse

5'-ggaaacagctatgacatg-3'

M13

5'-gtaaaacgacggccagt-3'

Primers pour l'amplification de la forme déletée de la Trx f

TFDel 1

5'-ccatgg¹aagccattgtaggg-3'

TFDel 2

5'-ggatcctca²actacttcgagcagc-3'

Primers pour la mutation de la Cys49 de la Trx f en sérine

TFC49S +

5'-ggtgtggaccgtc³taaagcaatggc-3'

TFC49S -

5'-attgagtaaacatatcaagaacaacagg-3'

Primers pour le clonage de la FBPase

FBPase 1

5'-ccatgg¹cagccgtaggagagggcggc-3'

FBPase 2

5'-ggatcctca²tgctaagtacttctctaatctctactcc-3'

Primers pour la mutagenèse de la FBPase

C155Sup	5'-cctaacgatgagtc ³ cattgttg-3'
C155Sdown	5'-gctataaatgccaaagatgg-3'
C174Sup	5'-cagaggtc ³ tgtagtgaatg-3'
C174Sdown	5'-ttcttctgcacttagctgtg-3'
C179Sup	5'-gtgaatgtatc ³ tcaaccagg-3'
C179Sdown	5'-tacacacctctgttcttctg-3'

- 1) Souligné: Site de restriction NCO I, gras: codon start.
- 2) Souligné: Site de restriction BamHI, gras: Codon stop.
- 3) Mutation du codon cystéine (tgt ou tgc) en sérine(tct ou tcc).

3.2.4 Sources d'ADN matrice disponibles dans le laboratoire

- Gène de la Trx f L et du mutant Trx f C73S L cloné dans le vecteur pKK233-MTTL pour la mutagenèse de la Cys49.
- Banque d'ADNc de jeunes feuilles d'épinard dans Unizap de Stratagene pour le clonage de la FBPase chloroplastique.

3.3 Méthodes de biologie moléculaire

La plupart des manipulations courantes en biologie moléculaire sont tirées du manuel « Molecular Cloning » (Sambrook et al., 1989).

3.3.1 Digestion d'ADN

Les digestions sont réalisées en suivant les indications des fournisseurs des enzymes de restriction (Promega, Gibco-brl, Boehringer-Mannheim, Stratagene, New England Biolabs).

3.3.2 Elution de fragments d'ADN

Les fragments d'ADN provenant d'une digestion ou d'une amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%. Pour les petits fragments ou afin de séparer deux fragments de taille proche, la concentration d'agarose est augmentée à 1%.

L'éluion de fragments a été réalisée à l'aide de trois méthodes différentes.

- Le système d'électroélution de Schleicher et Schüll, Elutrap, pour isoler des quantités importantes d'ADN.
- Le système d'électroélution direct développé au laboratoire où une poche est creusée directement dans le gel en aval de la bande d'intérêt . Cette poche est remplie de tampon d'électrophorèse filtré à 0.22 µm (0.5 X TBE : 45mM Tris

borate, 1mM EDTA). En rétablissant le courant, la bande d'intérêt poursuit son déplacement. La migration est suivie à l'aide d'une lampe UV et est stoppée quand les fragments se trouvent dans le liquide. Cette méthode a l'avantage d'être rapide, mais elle nécessite fréquemment une concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol ou par ultrafiltration sur Microcon (Amicon).

- Le pipetage direct qui consiste à «pomper» la bande d'intérêt avec une pipette automatique. Le rendement est médiocre, cette technique est utilisée pour éluer des fragments qui vont être ligués par des extrémités cohésives.

3.3.3 Ligation

Les ligations sont réalisées en suivant les instructions du fournisseur de l'ADN ligase du phage T4 (Gibco-BRL) avec une incubation à 16 °C de 4 heures au minimum.

3.3.4 Préparation d'un vecteur pBluescript T-sortant

La polymérase thermostable Taq qui est utilisée pour des amplifications par PCR a la propriété d'ajouter aux extrémités 3' du fragment néosynthétisé un nucléotide avec une préférence marquée pour les dATP. Cet ajout est gênant pour l'insertion dans un vecteur digéré bout-franc, mais, paradoxalement, il est possible d'en tirer profit pour diminuer la probabilité d'une recombinaison du plasmide sur lui-même, en utilisant cette activité de la Taq, pour adjoindre un dTTP aux extrémités 3' du vecteur digéré bout-franc.

pBluescript II KS+ digéré par EcoRV	2,5 µg
dTTP	4 mM
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
Taq DNA polymérase	2.5 unités
H ₂ O milliQ	Compléter à 50 µl

Concentration finale du vecteur pBluescript T sortant : 50 ng/µl.

3.3.5 Transformation

Les transformations et la préparation des cellules compétentes sont effectuées selon le protocole établi par Hanahan (Hanahan, 1987).

Lors de transformations de cellules à partir d'une préparation de plasmides pour une production de protéines, il est possible de raccourcir le protocole. L'ADN (>50 ng de plasmides concentrés) est ajouté aux bactéries compétentes fraîchement décongelées, puis le tube est directement plongé dans le bain à 42 °C pendant deux minutes, avant d'être placé à 4 °C pour 5 minutes. Ensuite les cellules sont étalées sur une boîte LB-agar contenant les antibiotiques de sélection.

3.3.6 Purification de plasmides

Les protocoles de lyse alcaline et de purification de plasmides pour grande et petite quantité sont tirés de Sambrook et al (Sambrook et al., 1989). Seule l'étape de la précipitation des plasmides avec le polyéthylène glycol est abandonnée, car elle occasionne des pertes importantes.

3.3.7 Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Deux ADN polymérases thermostables sont utilisées : Taq (Boehringer Mannheim)
Pfu (Stratagène)

3.3.7.1 Conditions d'amplification

3.3.7.1.1 Amplification de fragments avec deux primers simple brin

ADN matrice	50 ng
Primer 1	1 μ M
Primer 2	1 μ M
Désoxynucléotides triphosphates	200 μ M
Tampon de réaction	1 X
Polymérase Taq	1 Unité
H ₂ O milliQ	Complété à 50 μ l

Programme

Dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes.

Puis 30 X le cycle suivant :

Dénaturation	30 secondes à 94 °C
Hybridation	30 secondes à 45 - 60 °C suivant le primer
Elongation	60 secondes à 72 °C

3.3.7.1.2 Amplification avec un mégaprimé double brin contenant la mutation et un primer simple brin

ADN matrice	50 ng
Mégaprimé	2 μ l *
Primer 2	1 μ M
Désoxynucléotides triphosphates	200 μ M
Tampon de réaction	1 X
Polymérase Taq	1 Unité
H ₂ O milliQ	Complété à 50 μ l

* Le mégaprimé a été purifié puis concentré sur Microcon 100 (Amicon) jusqu'à un volume final d'environ 10 μ l correspondant à une concentration de 50 ng/ μ l approximativement.

Le programme du thermocycle reste le même.

3.3.7.2 Amplification du plasmide entier pour mutagenèse dirigée

ADN matrice	10 ng
Primer 1	0.5 μ M
Primer 2	0.5 μ M
Désoxynucléotides triphosphates	200 μ M
Tampon de réaction	1 X
Polymérase Pfu	1 Unité
H ₂ O milliQ	Complété à 50 μ l

Programme

Dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes.

Puis 30 X le cycle suivant :

Dénaturation	45 secondes à 94 °C
Hybridation	45 secondes à 45 - 60 °C suivant le primer
Elongation	2 minutes à 72 °C par kB

3.3.8 Séquençage

Le séquençage est réalisé selon les instructions fournies avec le kit d'Amersham DNA labstation 625 et avec un séquenceur automatique modèle 4000L de Li-Cor.

Les primers utilisés sont M13 et Reverse M13 pour séquencer dans le plasmide pBluescript et T7 pour séquencer dans pET 3d. Ces primers sont déjà modifiés en 5' par le chromophore IRD 800.

3.3.9 Mutagenèse dirigée

Deux méthodes de mutagenèse dirigée basées sur la PCR sont utilisées.

3.3.9.1 Méthodes de la double amplifications

Le processus se déroule en deux temps (Fig. 09).

La première étape consiste à amplifier partiellement le gène entre le primer contenant la mutation et un autre primer s'hybridant à la fin du gène. Le fragment ainsi obtenu est utilisé comme mégaprimers pour une deuxième PCR avec un primer au début du gène ce qui produit le gène complet (Baretino et al., 1994).

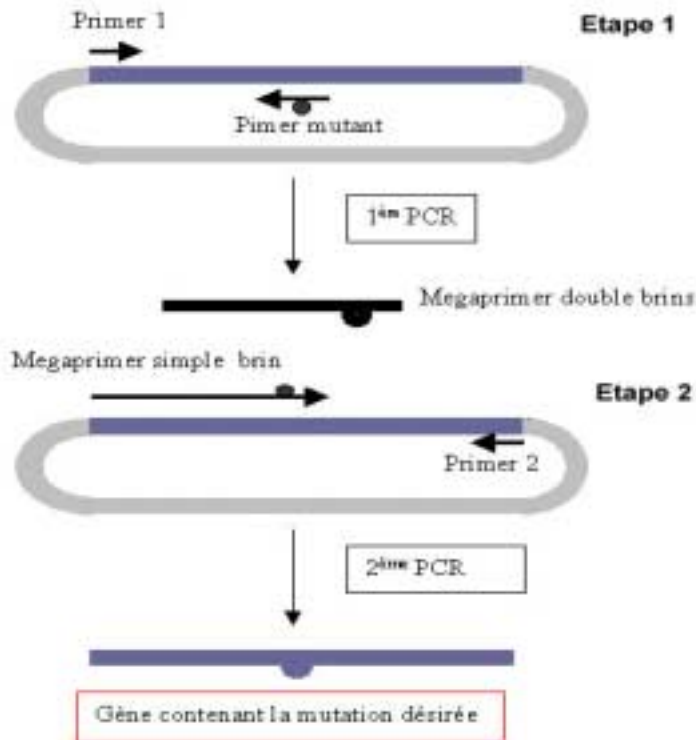


Figure 09
Représentation schématique de la méthode de mutagenèse dirigée par double-amplification.

3.3.9.2 Méthode amplifiant le vecteur dans son ensemble

Cette méthode, adaptée de Hemsley et al (Hemsley et al., 1989), permet d'obtenir le gène muté dans son vecteur linéaire en une seule amplification. En utilisant deux primers hybridant sur les brins opposés, dont l'un contient la mutation, et dont le sens de l'amplification est opposé, il est possible d'amplifier le plasmide en entier (Fig. 10). Il faut que les extrémités 5' des amorces soient alignées.

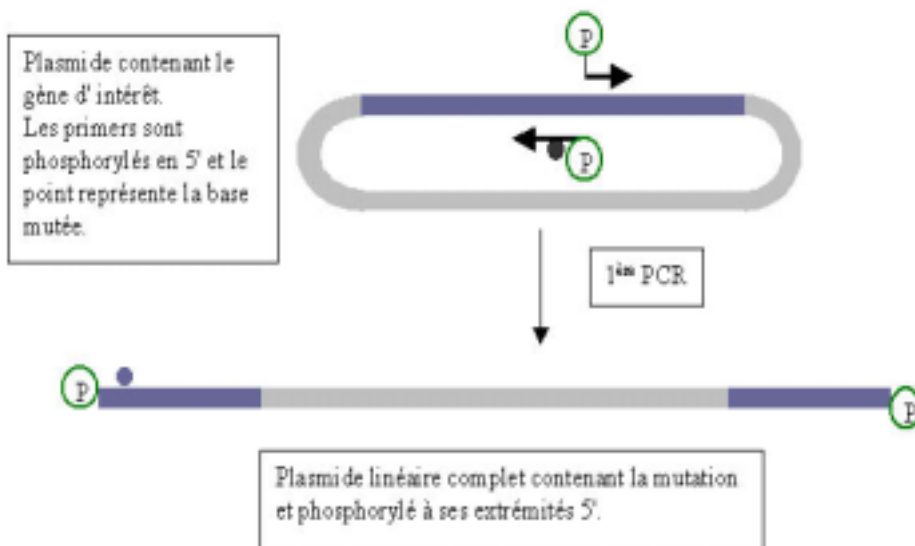


Figure 10
Représentation schématique de la méthode de mutagenèse dirigée par amplification du plasmide entier.

La forme linéaire contenant la mutation migre différemment de la forme circulaire du plasmide-matrice sur un gel d'agarose, ce qui permet de l'isoler. De plus en utilisant la Pfu DNA polymerase, on obtient des extrémités bout-franc ce qui facilite la ligation du vecteur sur lui-même.

3.3.10 Phosphorylation des primers

La ligase nécessite des extrémités 5' phosphorylées pour son activité, il est donc nécessaire de phosphoryler les primers au préalable afin de pouvoir liquer le plasmide sur lui-même .

Primer	10 μ M
T4 polynucleotide kinase	20 unités
Tampon de réaction	1 X
ATP	1mM
H ₂ O milliQ	Complété à 30 μ l final

Incuber 30 minutes à 37 °C, puis la kinase est inactivée à 95 °C pendant 2 minutes.

3.4 Méthodes relatives à l'expression et la purification de protéines recombinantes

3.4.1 Milieux de culture

LB	Tryptone	10 g
	Extraits de levure	5 g
	NaCl	10 g
	Pour 1 litre d'eau, autoclaver	
LB allégé	Tryptone	10 g
	Extraits de levure	5 g
	NaCl	5 g
	Pour 1 litre d'eau, à autoclaver	

3.4.2 Fermenteurs

Les tests d'expression sont réalisés dans des erlenmeyers avec des volumes de culture de 50 à 100 ml.

Pour les tests de production et de purification, des fermenteurs d'une capacité de 1.5 litres sont utilisés. Ils disposent d'une aération active fixe, ainsi que d'une thermostatisation et une agitation modulables.

Une fois la stratégie établie, la production de protéines est réalisée dans un fermenteur de 10 litres avec une aération, une thermostatisation et une agitation variables.

3.4.3 Conditions de culture

Toutes les cultures sont réalisées en présence d'ampicilline (100 μ g/ml) et de chloramphénicol (34 μ g/ml) pour la souche BL21 DE3 pLysS (seulement Amp pour

BN103), avec une agitation de 280 rpm pour les erlenmeyers et de 500 rpm pour les fermenteurs.

L'aération du petit fermenteur est de ~ 4 litres par minute et celle du grand est réglée à 18 -20 l/min.

Deux températures de cultures sont utilisées : 37 °C pour la FBPase et la Trx f L C49/73S, 22 °C pour les Trx f C49S et C49/73S.

L'inoculum est une culture saturée de 1/20 à 1/10 du volume de la culture. La croissance est suivie en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm en prenant garde à toujours diluer les échantillons de façon à ce que la valeur mesurée ne dépasse pas 0.3 d'absorbance.

La culture est induite avec 0.5 mM final d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) dès que la DO_{600nm} atteint 1.

Les cellules sont récoltées, dès que la phase de croissance commence à faiblir (inflexion de la courbe vers la phase stationnaire), ce qui prend environ 4-5 heures après l'induction pour les cultures à 37°C, par centrifugation (10 min, 4000 g, 4 °C).

3.4.4 Chromatographie

Colonne	Compagnie	Type	Taille
SP-Sépharose FF	Pharmacia	Echangeuse de cations	5 x 5.5 cm
Q-Sépharose FF	Pharmacia	Echangeuse d'anions	5 x 11.5 cm
Hydroxyapatite	Biorad	Interactions phosphates et/ou Ca ²⁺	1.5 x 14.5 cm
Séphacryl S-200 HR	Pharmacia	Tamissage moléculaire	4 x 98 cm
Séphadex G-50 Fine	Pharmacia	Tamissage moléculaire	2.6 x 95 cm

FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

MonoQ	Pharmacia	Echangeuse d'anions	1 ml
Superdex 75	Pharmacia	Tamissage moléculaire	24.2 ml
G-25 SF	Pharmacia	Tamissage moléculaire	8.2 ml
Superose 12	Pharmacia	Tamissage moléculaire	23 ml
Resource S	Pharmacia	Echangeuse de cations	1 et 6 ml
Phényl superose	Pharmacia	Interactions hydrophobes	1 ml

Les tampons utilisés pour la FPLC sont filtrés à 0.22 µm et dégazés 30 minutes dans un bain à ultrasons. Les conditions de séparations sont établies en tenant compte des propriétés propres aux différentes colonnes.

3.4.5 Système de concentration de protéines

Les cellules d'ultrafiltration proviennent de chez Amicon. La membrane est une YM10 pour la Trx f et une XM50 pour la FBPase. La pression d'azote appliquée correspond aux prescriptions du fournisseur.

3.5 Purification de la thiorédoxine f recombinante Trx f L C49S/C73S

La thiorédoxine f L a la propriété de former des corps d'inclusion dans le cytoplasme de la cellule BN103, ce qui facilite la purification de ces protéines. Ce phénomène d'agrégation est vraisemblablement dû aux quelques acides aminés hydrophobes rajoutés dans la partie N-terminale de la thiorédoxine lors du clonage du gène dans le vecteur pKK. Le protocole a été développé par Aguilar et al. (Aguilar et al., 1992).

3.5.1 Lyse cellulaire

Les bactéries sont récoltées par centrifugation (SLA, 5000 rpm, 10 min, 4°C), puis resuspendues dans 30 ml de tampon (50 mM Tris-Cl pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1 mM PMSF). Le lysozyme est ajouté pour atteindre une concentration de 1 mg/ml et la suspension est laissée 15 min. à 25 °C avant d'être congelée.

Après décongélation, de la benzonase (Merck) est ajoutée à raison de 2.5 unités par ml ainsi que du MgCl₂ (10 mM) et les cellules sont incubées 1h à 37 °C pour digérer les acides nucléiques, puis centrifugées (SS-34, 13 000 rpm, 10 min, 4 °C). Le surnageant est jeté.

3.5.2 Isolation des corps d'inclusions

Le culot est lavé dans 30 ml de tampon (50 mM Tris-Cl pH 7.3, 1 M urée, 10 mM EDTA) sous agitation pendant 10 min puis centrifugé (20 000 g, 10 min, 4°C). L'opération est renouvelée 4 fois.

Pour finir le culot de corps d'inclusion est lavé 2 fois avec de l'eau froide comme ci-dessus.

3.5.3 Solubilisation

Les corps d'inclusions sont solubilisés dans un tampon 50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA-Na, 14 mM MET ajusté à pH 10.5 avec KOH, sous agitation lente (4 h, température ambiante) à une concentration de 5 mg/ml. Puis la solution est centrifugée (SS-34, 48 000g, 15 min, 4°C).

3.5.4 Renaturation

Les Trx f L C49/73S solubilisées sont renaturées par deux dialyses consécutives de 24 h sous agitation lente dans du tampon 20 mM TEA-acétate pH 7.0, 14 mM MET. Les protéines sont diluées dans le tampon à une concentration de 1 mg/ml puis distribuées dans des sacs de dialyse (Spectra/Por 6-8000, 8 ml/cm). La première dialyse se fait à température ambiante, puis la seconde à 4°C. Les Trx f L non renaturées sont éliminées par centrifugation (SS-34, 48 000g, 30 min, 4°C).

3.5.5 Chromatographie

Finalement les Trx f L C49/73S sont purifiées sur une colonne Q-Sépharose équilibrée avec du tampon 20 mM TEA-acétate pH 7.0, 14 mM MET, 2 % DMSO. L'élution de la Trx f L se fait avec un gradient linéaire de 0 à 300 mM de NaCl (1000 ml).

3.6 Purification des Trx f C49S et C49S/C73S

Cette forme raccourcie ne forme pas de corps d'inclusion, la délétion de 12 acides aminés N-terminaux par rapport à la forme longue la rend soluble et plus stable (del Val, 1996).

3.6.1 Choc osmotique

La première étape consiste à resuspendre les cellules dans un milieu hypertonique A (20% saccharose, 2.5 mM EDTA-Na pH 8.0, 50 mM MES-NaOH pH 6.1) dont le volume correspond à 1/10 du volume de la culture. Un laps de temps est laissé afin qu'un nouvel équilibre osmotique se forme par expulsion d'eau de la cellule (10 min, 4°C et agitation lente avec un barreau magnétique). Les bactéries sont récupérées par centrifugation (10 min, 10 000 g, 4°C). La deuxième étape provoque un choc hypotonique par resuspension des bactéries dans un tampon B dépourvu de saccharose (2.5 mM EDTA-Na pH 8.0, 50 mM MES-NaOH pH 6.1, 100 µM PMSF, 14 mM MET). La solution est incubée sous agitation lente pendant 15 minutes à 4°C, puis centrifugée (10 min, 10 000 g, 4°C).

Lors de cette étape, les cellules se gonflent rapidement d'eau, ce mouvement est accompagné par un déplacement de petites molécules, dont les thiorédoxines, de l'intérieur vers l'extérieur des bactéries. Ce relâchement est favorisé par l'EDTA qui chélate les lipopolysaccharides membranaires ce qui déstabilise les membranes. La majorité des thiorédoxines f se retrouvent dans le surnageant alors qu'une partie importante des autres protéines cytoplasmiques et des acides nucléiques sont éliminés avec le culot de bactéries (Nossal & Heppel, 1966; Lunn & Pigiet, 1982).

3.6.2 Colonne SP-Sépharose

Le surnageant est chargé sur une colonne SP-Sépharose équilibrée avec du tampon 50 mM acide malonique-NaOH pH 6.0, 14 mM MET. L'élution se fait avec un gradient de 0 à 200 mM NaCl dans le même tampon (2000 ml). Les fractions contenant la Trx f sont combinées puis concentrées par ultrafiltration sur une membrane YM10 jusqu'à un volume inférieur à 20 ml.

3.6.3 Tamisage moléculaire G-50F

L'échantillon est chargé sur la colonne G-50 équilibrée avec du tampon 50 mM MES-NaOH pH 6.1, 50 mM NaCl, 14 mM MET. Les fractions contenant la Trx f sont réunies, concentrées par ultrafiltration puis diafiltrées avec 5 volumes du tampon ci-dessus sans NaCl.

3.6.4 Concentration avec du polyéthylène glycol (PEG)

La Trx f C49/73S est concentrée par dialyse contre du PEG. La solution de protéines est mise dans un sac de dialyse (6-8000 Da), puis le sac est recouvert de PEG-20 000 en poudre ce qui provoque la sortie du tampon. Cette méthode présente l'avantage d' être beaucoup plus douce que l'ultrafiltration.

3.7 Purification de la FBPase

3.7.1 Lyse cellulaire

Les bactéries sont resuspendues dans un volume minimal de tampon 30 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA-Na, 10 mM NaCl, puis congelées ce qui provoque la lyse cellulaire. Après décongélation, un traitement nucléasique est nécessaire afin de liquéfier la solution (25 U Benzonase (Merck) par 10 ml de solution). Ensuite les protéines solubles sont séparées des débris cellulaires par centrifugation (48 000g, 15 min, 4°C).

3.7.2 Précipitation acide

Le point isoélectrique calculé pour la FBPase se situe aux environs de 4.8, le pH de l'extrait de protéines brut est abaissé à 5.2 avec de l'acide formique dilué ce qui précipite de nombreuses protéines alors que la FBPase reste en solution. Une centrifugation (SS-34, 48 000g, 20 min, 4°C) permet d'éliminer toutes les protéines précipitées. Le pH est ensuite remonté à 5.5 avec du NaOH 0.1 M.

3.7.3 Colonne Q-Sépharose

L'échantillon est chargé sur une colonne Q-Sépharose équilibrée avec du tampon 50 mM Na-Acétate pH 5.5. L'élution se fait avec un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl (2000 ml). Les fractions actives sont combinées et concentrées par ultrafiltration sur XM50 si la concentration en protéines est inférieure à 0.3 mg/ml, sinon par précipitation au sulfate d'ammonium (95 % de saturation).

3.7.4 Hydroxyapatite (étape supplémentaire)

Dans les cas de grosses cultures de 10 litres, il arrive que le pic contenant la FBPase ne soit pas bien séparé sur la Q-Sepharose. Il est alors nécessaire de faire cette étape supplémentaire.

Le pH de la solution de protéines est élevé à 7.0 avec du K₂HPO₄, puis l'échantillon est chargé sur une colonne d'hydroxyapatite équilibrée avec du tampon 20 mM KPi pH 7.0. L'élution se fait avec un gradient de 20 à 250 mM KPi pH 7.0 (1000 ml). Les fractions actives sont combinées et concentrées comme après la Q-Séparation.

3.7.5 Tamisage moléculaire S-200

L'échantillon concentré est alourdi avec du glucose si nécessaire, puis centrifugé (SS-34, 48 000g, 30 min, 4°C). Il est ensuite déposé directement à la surface de la résine S-200 équilibrée avec 50 mM Na-Acétate pH 5.5, 50 mM NaCl. Les fractions actives sont combinées, concentrées sur XM50 et diafiltrées avec 5 volumes de tampon 50 mM Na-Acétate pH 5.5.

3.8 Méthodes relatives à l'enzymologie

3.8.1 Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

Le protocole pour préparer les gels SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) a été décrit par Laemmli (Laemmli & Favre, 1973). La concentration en acrylamide du gel de séparation varie de 12 à 15 % et celle du gel de concentration est de 4 %. La migration des protéines se fait à un voltage constant de 200 V dans le tampon 25 mM Tris-Cl pH 8.3, 192 mM Glycine et 0.1 % SDS.

La référence de poids moléculaire est le standard de protéines précolorées de GibcoBRL.

Protéines	Poids moléculaire publié (Da)	Poids moléculaire apparent (Da)
Lysozyme	14'300	14'000
β-Lactoglobuline	18'400	20'400
Anhydrase carbonique	29'000	28'600
Ovalbumine	43'000	42'700
Albumine sérique de boeuf	68'000	66'700
Phosphorylase B	97'400	98'500
Myosine (chaîne H)	200'000	193'900

3.8.1.1 Coloration des gels SDS

Solution de fixation: 62.5 % Isopropanol
25 % Acide acétique

Solution de coloration: 0.25 % Bleu de Coomassie
50 % méthanol
10 % Acide acétique

Solution de décoloration: 5 % méthanol
7 % Acide acétique

Le protocole de coloration des minigels nécessite un four à micro-ondes réglé à 450 Watt.

1. Tremper le gel dans la solution de fixation et placer le tout 5 minutes dans le four.
2. Transférer le gel dans la solution de coloration et chauffer 5 minutes dans le four.
3. Retremper le gel dans la solution de fixation et chauffer 5 minutes ce qui enlève l'excès de bleu de Coomassie.
4. Transférer le gel dans la solution de décoloration avec un morceau de mousse synthétique qui fixe le colorant et placer l'ensemble dans le four pendant 15-20 minutes.

3.8.2 Immunoblot

3.8.2.1 Transfert électrophorétique

Après la séparation sur gel SDS, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (0.2 μm , BA83 de Schleicher & Schuell) avec un courant fixe de 2 mA/cm² de gel dans un système "semi-dry".

Tampon de transfert: 45 mM Tris
25 mM Glycine
1.3 mM SDS
20 % Méthanol

3.8.2.2 Révélation immunologique du filtre

Solutions

Tampon TBS (Tris Buffered Saline): 20 mM Tris pH 7.5
500 mM NaCl

Tampon TTBS: TBS
0.05 % Tween-20

Lait-TBS 5 et 1%:	TBS 5 et 1 % respectivement de lait en poudre dégraissé
Solution de coloration:	TBS 500 µg/ml de 4-chloro-1-naphtol (dans du méthanol) 0.015 % H ₂ O ₂

1. Après le transfert, laver le filtre avec de l'eau distillée.
2. Bloquer le filtre avec le lait-TBS 5 % pendant 45 min.
3. Mettre dans un sachet en plastique 10 ml de lait-TBS 1 % par dm² de membrane, le filtre et l'anticorps de lapin dirigé contre la protéine. Sceller le plastique et incuber au minimum 1.5 h.
4. Laver le filtre 2 X 10 min dans le TTBS, puis rincer à l'eau distillée.
5. Répéter l'étape 3, mais en utilisant 5 µl/10 ml d'anticorps de chèvre anti-lapin marqués à la peroxydase (Biorad) et une incubation de 1 h.
6. Répéter l'étape 4.
7. Révélation avec la solution de coloration préparée à l'instant pendant 5 à 15 minutes suivant l'intensité de la réaction.

3.8.3 Détection des mutants de Trx f lors de la purification

La mutation d'une des cystéines du site actif en sérine rend l'utilisation du test d'activation de la FBPase inutile pour détecter les Trx f mutées lors de leur purification. C'est pourquoi l'utilisation de l'appareil de microfiltration Bio-Dot s'est révélée nécessaire. Un échantillon de chaque fraction de colonne est injecté dans les puits, puis le vide est fait ce qui dépose les protéines sur la membrane de nitrocellulose. Ensuite, il suffit de procéder comme pour la révélation d'un filtre immunologique.

3.8.4 Détermination du coefficient d'extinction molaire de la FBPase recombinante WT

Un échantillon de FBPase est dialysé de manière extensive contre un tampon volatile (20 mM formiate d'ammonium pH 5.8) puis le spectre UV de cette solution de protéines est enregistré. Les protéines sont ensuite réparties dans des tubes Eppendorf secs et tarés à raison de environ 3 mg de protéine par tube. Cinq tubes sont également remplis du même volume de tampon de dialyse afin d'avoir une référence. Puis les échantillons sont lyophilisés par centrifugation sous vide avant d'être placés dans un dessiccateur pour plusieurs jours. Les pesages sont répétés trois fois et le coefficient d'extinction est calculé à l'aide de l'absorbance mesurée, de la moyenne des masses pesées et du poids moléculaire calculé de la FBPase recombinante (157300 gr/mol).

3.8.5 Dichroïsme circulaire

Les échantillons de protéines sont dialysés contre du tampon 10 mM K-phosphate pH 6.0 afin d'avoir les protéines dans un milieu optiquement inactif. Puis la concentration de FBPase est calculée avec le coefficient d'extinction molaire déterminé expérimentalement de $144\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 279 nm et l'absorbance mesurée à cette longueur d'onde. Les spectres CD sont enregistrés de 190 nm à 360 nm pour des solutions de FBPase de 1.5 μM dans une cuvette de 0.1 cm à 25 °C. L'analyse de la composition de la structure secondaire est achevée à l'aide du programme CD Deconvolution développé par le Dr. Gerald Boehm de l'institut pour les biotechnologies de l'université Martin Luther de Halle-Wittenberg (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn>).

3.8.6 Tests d'activité

3.8.6.1 Test discontinu par dosage de phosphates inorganiques

Ce test se déroule en deux temps (Schürmann et al., 1981). Dans un premier temps la FBPase (ou un échantillon de la fraction de colonne) est mise en présence de son substrat dans des conditions permettant son activité.

Mélange réactionnel : Tris-Cl pH 8.5 à 25°C	100 mM
EGTA-Na	0.1 mM
MgSO ₄	16 mM
FBP-Na	6 mM
FBPase	?
Dans un volume final de 500 μl .	

Ce mélange est incubé à 25 °C pendant un temps précis, puis la réaction enzymatique est stoppée en ajoutant 2 ml de réactif Pi-mix qui permet un dosage colorimétrique des phosphates libérés.

Pi-mix :	H ₂ O bidistillée	60 ml
	H ₂ SO ₄ dilué 5 X	10 ml
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O (6.7g/ml)	10 ml
	FeSO ₄	1.25 g

Ce réactif complexe le phosphate libre et donne une coloration bleue qui est mesurée au spectrophotomètre à 740 nm. Pour des dosages quantitatifs, il est nécessaire de préalablement établir une courbe standard de Pi.

3.8.6.2 Test cinétique

Il existe deux variantes de ce test. Le premier permet de mesurer l'activité de la FBPase dans un milieu à pH élevé (8.5) et avec une concentration de magnésium de 16 mM, alors que le suivant implique l'activation de la FBPase par la Trx f dans des conditions plus proche de la voie physiologique.

Ces deux tests nécessitent l'ajout de deux enzymes complémentaires permettant le couplage de l'activité de la FBPase avec la production de NADPH qui est mesuré au spectrophotomètre à 340 nm (Fig. 11) (Schürmann et al., 1981).

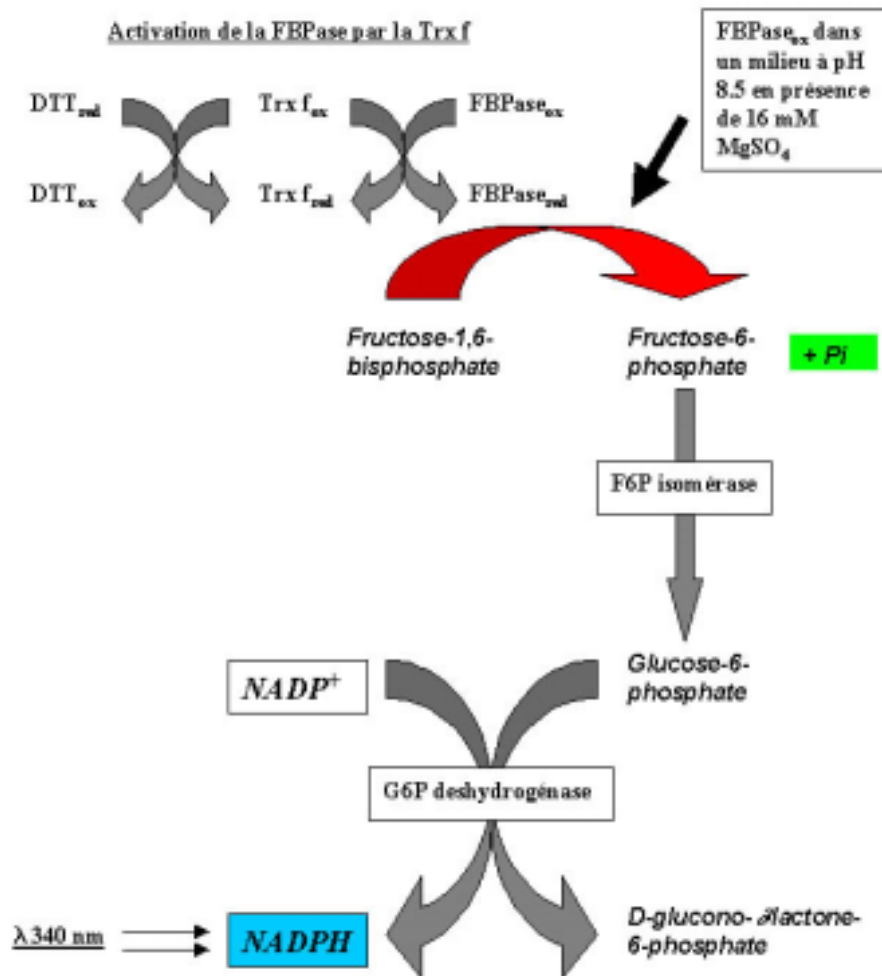


Figure 11

Représentation schématique des différentes réactions enzymatiques qui permettent de suivre indirectement l'activité de la FBPase au spectrophotomètre

3.8.6.3 Test cinétique standard

Tris-Cl pH 8.5	100 mM
EGTA-Na	0.1 mM
MgSO ₄	16 mM
FBP-Na	1 mM
IM + DH	1.75 + 0.7 U
NADP	0.3 mM
MET	14 mM
FBPase	?

La FBPase est ajoutée au dernier moment, directement dans la cuvette du spectrophotomètre, et brièvement agitée. L'ensemble du système est thermostatisé à 25°C. La formation du NADPH est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

3.8.6.4 Test d'activation de la FBPase

Activation de la FBPase

Tris-Cl pH 7.9	100 mM
DTT réduit	5 mM
Trx f	2 μ M
FBPase	?

Ce mélange d'activation est incubé un temps fixe (en général 5 min) à 25 °C, puis un volume précis est injecté dans une cuvette contenant le milieu réactionnel suivant:

Tris-Cl pH 7.9	100 mM
EGTA-Na	0.1 mM
MgSO ₄	1.5 mM
FBP-Na	1 mM
IM + DH	1.75 + 0.7 U
NADP	0.3 mM
MET	14 mM
Mélange Ax	X μ l

Le coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm est $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En mesurant l'augmentation de l'absorbance en fonction du temps, il est possible de calculer la quantité de NADPH produit par minute (en général nmoles/min) qui est équivalente à la quantité de fructose-1,6-bisphosphate clivé en F6P + Pi par minute.

3.8.7 Mesure de l'activité de la FBPase en fonction du Mg²⁺

L'activité de la FBPase oxydée (inactive) et réduite (active) est testée dans le mélange réactionnel à pH 7.9 décrit ci-dessus mais contenant des concentrations de magnésium variables. La protéine est testée sous la forme oxydée ainsi qu'après réduction par la Trx f pendant 10 min dans le mélange d'activation décrit ci-dessus. Les résultats sont traités avec le programme Kaleidagraph (Synergy Software) et l'équation de Hill simplifiée (Geck & Hartman, 2000) afin d'obtenir une sigmoïde et la concentration de demi-saturation $S_{0.5}$.

Equation de Hill simplifiée: $V = V_{\text{max}} [S]^n / (K' + [S]^n)$

A partir de cette équation on peut calculer le $S_{0.5}$: $S_{0.5} = K'^{1/n}$

3.8.8 Détermination du potentiel d'oxydoréduction de la FBPase

Le protocole utilisé pour la détermination du potentiel redox (E_m) est celui développé par Hirasawa et al. (Hirasawa et al., 1999) avec des modifications mineures.

Solutions à préparer: 20 mM DTT réduit
 20 mM DTT oxydé
 Tampon 1 M à pH précis Na-acétate pH 5.5
 Bis-Tris-Cl pH 6.0, 6.5, 7.0
 Tricine-NaOH pH 7.5, 8.0, 8.5

Les solutions de DTT réduit et oxydé sont précisément mélangées afin d'obtenir une échelle de potentiels définis. L'équilibre de ces mélanges redox est contrôlé par un dosage des thiols libres avec le réactif d'Ellman (Fig. 12) (Habeeb, 1972).

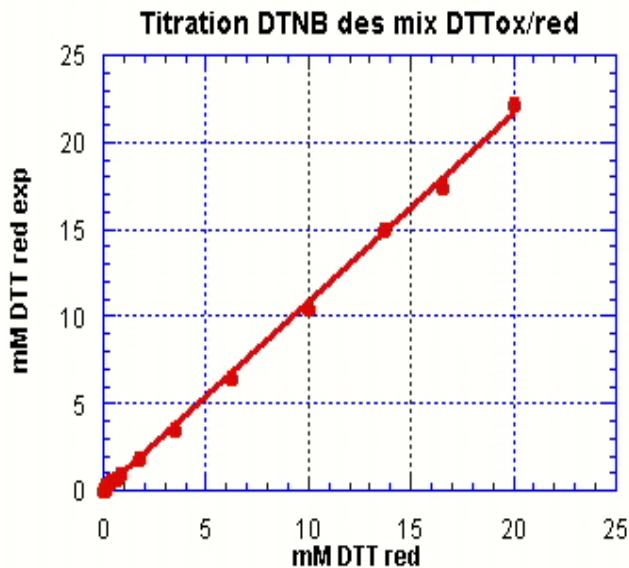


Figure 12.

Détermination de la concentration de DTT réduit dans les mélange redox avec le réactif d'Ellman (DTNB). Abscisse, concentration de DTT_{red} théorique et ordonnée, concentration de DTT_{red} mesurée.

Un mélange contenant la FBPase, le tampon et une quantité catalytique de Trx f est préparé:

Tampon	200 mM
EDTA-Na pH 8.0	2 mM
Trx f	0.2 μ M
FBPase	\sim 0.0066 U/ μ l

Puis 50 μ l de ce mélange sont distribués dans des Eppendorfs auxquels il faut ajouter également 50 μ l de mélange DTT ox/red avant de les incuber 2 heures à 25°C sous argon afin de permettre aux échantillons de s'équilibrer au potentiel ambiant (E_h).

Finalement des échantillons de ces tubes sont testés pour déterminer le pourcentage de FBPase activée (réduite) pour chaque potentiel.

Les résultats de ces titrations ont été adaptés à l'équation de Nernst avec le programme informatique Kaleidagraph (Synergy Software) en utilisant la valeur $n=2$ correspondant à un échange de deux électrons.

De plus le processus d'oxydoréduction implique le transfert de deux protons, ce qui nécessite une correction des potentiels suivant le pH. Les calculs de potentiels sont basés sur un E_m pour le DTT à pH 7.0 de -330 mV (Hirasawa et al., 1999). Une dépendance de -59 mV par unité de pH est utilisée (Allen & Holmes, 1993).

Le mélange réactionnel utilisé pour déterminer l'activité de la FBPase C179S est celui décrit précédemment, alors que pour la FBPase WT le milieu réactionnel est celui décrit par Hirasawa et al (Hirasawa et al., 1999) qui contient une concentration de magnésium de 10 mM.

3.8.9 Titration des thiols libres

Le dosage des thiols libres a été fait en utilisant le réactif d'Ellman (DTNB) (Habeeb, 1972). La libération de TNB^- est mesurée à 412 nm et le calcul de la molarité est basé sur le coefficient d'extinction de $13\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La quantité de FBPase est calculée avec le coefficient d'extinction et l'absorbance à 279 nm.

Le dosage des cystéines libres accessibles est fait dans du tampon 100 mM TEA-Cl pH 7.0, 1 mM EDTA-Na et en présence de 0.008 % DTNB. La quantité de protéines doit être calculée pour que la quantité de cystéines modifiées se situe dans la fourchette de 10 - 20 nmol/ml. Le dosage des -SH totaux se fait de même, mais dans un tampon Tris-Cl pH 8.0 et en présence de SDS 2 %.

3.8.10 Formation d'hétérodimères Trx f-FBPase

La concentration des protéines est calculée avec l'absorbance à 279 nm et le coefficient d'extinction molaire de $144\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour la FBPase et de $14\,230\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour la Trx f. La FBPase et la Trx f sont mélangées dans un rapport variant de 1:4 à 1:40 suivant les expériences dans 50 mM TEA-Cl pH 7.0 et incubées 30 minutes à 25°C.

L'addition d'oxydant se fait dans le mélange à des concentrations de 1.5 et 3 mM pour le cuivre (CuSO_4) et de 10 mM pour la diamide (N,N,N',N'-tetraméthylazodicarboxamide) (Kosower et al., 1969).

Les différents échantillons sont ensuite séparés sur gel SDS-PAGE, colorés au bleu de Coomassie ou transférés sur nitrocellulose et révélés par détection immunologique.

4 RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1 PARTIE I: BIOLOGIE MOLECULAIRE

4.1.1 Clonage du gène codant pour la FBPase chloroplastique d'épinard

Le gène de la FBPase chloroplastique d'épinard ayant déjà été décrit dans la littérature, il a été possible de l'isoler directement d'une banque d'ADNc de plantule d'épinard par amplification par PCR. Les amorces FBPase1 et FBPase2 ont été synthétisées en y incluant les sites de restriction nécessaires au clonage dans le vecteur d'expression pET-3d et de façon à n'amplifier que la partie codant pour la protéine mature. Le produit de la PCR a été introduit dans le vecteur pBluescript II KS+ T-sortant et séquencé (Fig. 13) avant d'être sous-cloné dans le vecteur d'expression par les sites NcoI et BamHI. Le site NcoI fournit par la même occasion le codon ATG initiant la traduction de l'ARNm par les ribosomes procaryotiques et qui code pour une méthionine.

Cette séquence en nucléotide correspond à celle précédemment publiée par Martin et al. (Martin et al., 1996) et diffère également en trois positions (en gras dans la figure 13) par rapport à la séquence en acides aminés publiée par Marcus et al. (Marcus & Harsch, 1990). Un glutamate à la place d'une glutamine en position 10, un glutamate à la place d'une proline en position 32 et un aspartate à la place d'une proline en position 247. Ces différences mineures sont vraisemblablement dues à des erreurs lors du séquençage des protéines plus qu'à des variations intraspécifiques comme le propose Martin et al. En effet, la comparaison des séquences amino-acidiques des différentes FBPases chloroplastiques connues confirme que le Glu₃₂ et l'Asp₂₄₇ sont strictement conservés, alors que la présence de Pro à ces positions entraînerait des modifications structurales importantes.

La méthionine initiant la traduction est absente de certaines protéines recombinantes. Seul le séquençage de la partie N-terminale aurait fourni une indication sur la présence cette Met. Cependant, en se basant sur des travaux récents (Reichert et al., 2000), où la même construction a été réalisée, puis séquencée, il y a de grandes probabilités que la Met soit absente.

La présence d'une alanine après la méthionine tend également vers une excision de cette Met. Il a été démontré que plus la chaîne latérale de l'acide aminé qui suit la méthionine initiatrice est courte plus la probabilité d'une absence de cette dernière est élevée dans les systèmes d'expression procaryotiques (Hirel et al., 1989).

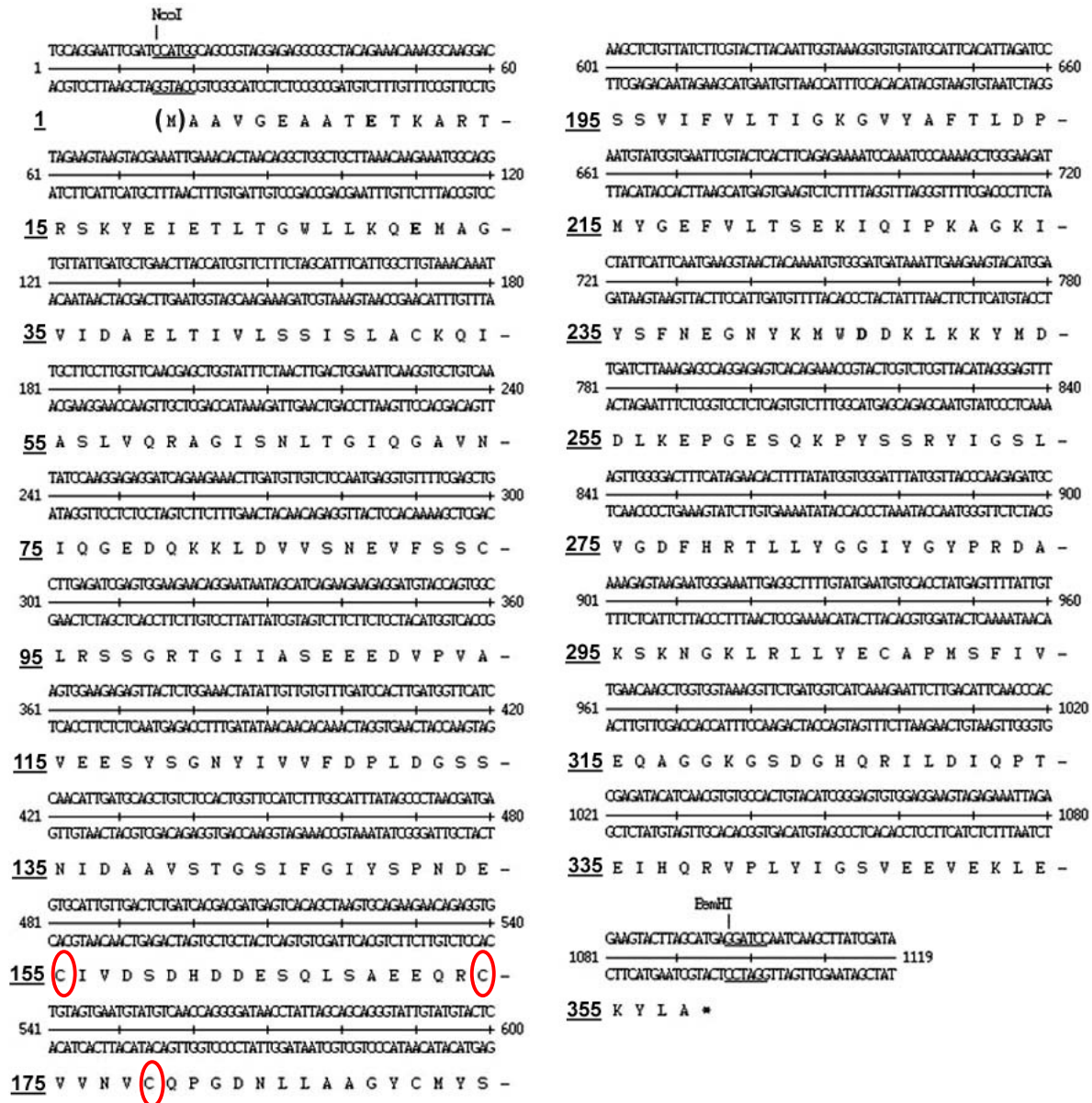


Figure 13. Séquence de la FBPase chloroplastique recombinante d'épinard. Les trois cystéines de la zone de régulation sont entourées en rouge.

4.1.2 Mutagenèse dirigée

4.1.2.1 Thiorédoxine f

Suite à de précédents travaux (Aguilar et al., 1992; del Val, 1996), le laboratoire disposait déjà de la Trx f WT sous deux formes, l'une plus courte de 12 acides aminés (Trx f) que l'autre (Trx f L) et d'un mutant (Trx f L C73S) de la forme longue. Par la méthode de mutagenèse par double amplification, la cystéine 49 a été remplacée par une sérine en utilisant la Trx f et la Trx f L C73S avec les amorces TFC49S+, TFDel 1 et TFDel 2 afin d'obtenir les mutants délétés Trx f C49S et C49/73S qui ont été clonés dans pBluescript, séquencés afin de contrôler la présence de la mutation, puis sous-clonés dans le vecteur d'expression pET-3d.

D'autre part, la méthode de mutagenèse par amplification du plasmide complet a été utilisée avec la forme longue Trx f L C73S et les amorces C49S+ et C49S-phosphorylées en 5' afin d'obtenir le mutant Trx f L C49/73S. Le résultat de la PCR est le plasmide linéaire qu'il faut ensuite religuer sur lui-même. Le contrôle de la mutation a nécessité le transfert du gène dans le vecteur pBluescript pour pouvoir le séquencer car le vecteur pKK233-2 MTTL qui contient la forme longue ne se prête pas au séquençage automatique.

4.1.2.2 Fructose-1,6-bisphosphatase

Toutes les mutations ont été réalisées par la méthode de l'amplification du plasmide entier (Fig. 14). Le premier cycle de mutation a produit les trois simple-mutants, FBPase C155S, C174S et C179S, puis la série suivante les double-mutants, FBPase C155/174S, C155/179S et C174/179S. Tous ces clones ont été contrôlés par séquençage dans le vecteur pET-3d à l'aide de l'amorce T7 modifiée. A cause de la taille relativement importante du gène de la FBPase (>1000 paires de bases), certains de ces mutants n'ont pas pu être contrôlés jusqu'à la fin du gène avec une seule amorce. Ces cas litigieux ont été transférés dans le plasmide pBluescript et ont été séquencés dans les deux sens grâce aux primers M13 et Reverse M13.

Ref 1 2 3 4 5 6 7

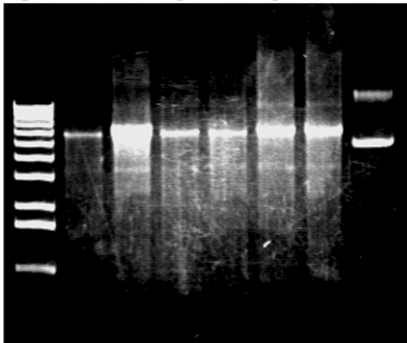


Figure 14. Amplification du plasmide pET-FBPase entier pour la mutagenèse. 1&2 FBPase C155S, 3&4 FBPase C174S, 5&6 FBPase C179S, 7 FBPase WT utilisé comme matrice. Les formes linéaires (1-6) migrent différemment de la matrice circulaire relâchée ou enroulée (7).

Gel agarose 0.8% coloré au bromure d'éthidium.

4.1.2.3 Résumé

Le tableau ci-dessous résume les différents clones utilisés pour la suite.

Clone	Remarques
Trx f WT	Forme courte, soluble
Trx f C49S	Forme courte, soluble, Cys interne du site actif muté
Trx f C49/73S	Forme courte, soluble, Cys46 est la seule conservée
Trx f L C49/73S	Forme longue, insoluble, Cys46 seule conservée
FBPase WT	Forme native, mature
FBPase C155S	Simple-mutants de la FBPase.
FBPase C174S	Les trois cystéines mutées sont dans l'insertion permettant la régulation par la thiorédoxine f.
FBPase C179S	
FBPase C155/174S	Double-mutants de la FBPase.
FBPase C155/179S	L'insertion ne contient plus qu'une seule cystéine.
FBPase C174/179S	

4.1.2.4 Remarques sur la mutagenèse dirigée

L'avantage de la méthode de mutagenèse dirigée par amplification du plasmide entier est sa rapidité et le peu de manipulations nécessaires pour obtenir le gène muté dans le vecteur d'expression. En effet une seule réaction PCR et une seule ligation sont impliquées, alors que la méthode de la double amplification requiert deux PCR, une ligation, puis un sous-clonage dans le vecteur d'expression. Par contre l'amplification d'un plasmide de taille conséquente (~5 kB) augmente considérablement les risques d'erreurs de copies et nécessite des conditions de réaction d'amplification optimales. Ces désavantages ont été en partie compensés par l'utilisation de la Pfu DNA polymérase qui possède la capacité de contrôle et de correction du brin néosynthétisé (Proof-Reading).

5 RESULTATS ET DISCUSSIONS

5.1 PARTIE II: EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES

5.1.1 Thiorédoxine f (forme courte)

La croissance des cellules à 22 °C est très lente, mais d'après les travaux précédents (del Val, 1996), il semble justement que cela favorise l'expression des Trx f. Dans le cas des mutants, les protéines recombinantes ralentissent encore la croissance des bactéries vraisemblablement à cause du thiol libre du site actif qui peut gêner le métabolisme bactérien. C'est pourquoi les bactéries BL21 DE3 pLysS sont utilisées, car elles supportent un deuxième antibiotique ce qui permet une double sélection ampicilline/chloramphénicol qui limite la croissance des contaminants qui ont tendance à croître très rapidement quand la pression des antibiotiques diminue.

L'expression des mutants Trx f C49S et C49/73S reste malgré tout extrêmement faible spécialement pour le double-mutant (Fig. 15). Plusieurs causes peuvent être avancées, comme une possible interaction de ces protéines avec le métabolisme bactérien ainsi que l'instabilité de la Trx f double-mutante qui la rend beaucoup plus sensible à la dégradation par les bactéries.

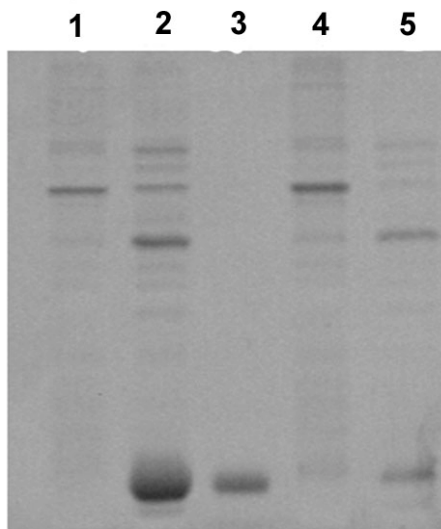


Figure 15. Expression de la Trx f C49S et C49/73S. 1&4, extrait de protéines brutes avant induction et 2&5 après induction. 1&2. Trx f C49S, 4&5. Trx f C49/73S
3. Référence Trx f WT

La purification se fait en trois étapes qui permettent d'obtenir une Trx f homogène. La première consiste en un choc osmotique qui a l'avantage d'expulser les Trx f tout en retenant beaucoup de protéines contaminantes ainsi que la majeure partie des acides nucléiques dans les cellules. Des contrôles par gel SDS ont démontré que la quantité de Trx f restant dans les cellules après le choc est très faible (del Val, 1996). Cette perte est négligeable au vu des gains pour le rapport Trx f/protéines totales de l'extrait de protéines brut.

La solution protéique résultant du choc osmotique est ensuite filtrée avant d'être appliquée sur une colonne échangeuse de cations (sulphopropyl) équilibrée à pH 6.0. A ce pH, il n'y a pratiquement que la Trx f (pI calculé 6.3, mesuré 7.15) qui va être retenue, de plus les acides nucléiques présents n'interagissent pas avec la résine car ils sont chargés négativement. Le profil d'élution avec le gradient de NaCl présente un pic principal

à ~80 mM NaCl qui contient principalement la Trx f avec quelques traces de contaminants d'une taille nettement plus élevée ce qui permet d'achever la purification avec une colonne de tamisage G-50 (Voir Annexe 1). Finalement la Trx f C49S est concentrée et diafiltrée dans une cellule Amicon à une concentration finale élevée (~6 mg/ml) et présente un rendement final de 10 mg/l de culture. La Trx f C49/73S doit être dialysée, puis concentrée avec du PEG, car l'agitation mécanique de la cellule Amicon provoque rapidement la formation d'un précipité. De plus la concentration avec le PEG doit être arrêtée à relativement basse concentration pour éviter de perdre le double-mutant par précipitation. Le rendement des différentes productions de Trx f C49/73S n'a jamais excédé 1.5 mg/l de culture.

Les Trx f mutées ont été aliquotées et stockées à -20 °C toujours en présence de 14 mM MET afin d'éviter la formation d'homodimères. Une fois décongelés, les deux mutants forment rapidement un précipité, spécialement pour la Trx f C49/73S, ce qui limite leur conservation à 4 °C.

5.1.2 Thiorédoxine f L (forme longue)

La Trx f L est insoluble dans le cytoplasme et forme des corps d'inclusion dus à l'adjonction de quelques acides aminés lors du clonage dans le vecteur pKK (Aguilar et al., 1992). Cette propriété est utilisée dans le but d'augmenter la production de Trx f C49/73S en évitant les interférences possibles de ce mutant avec le métabolisme bactérien. La production de Trx f L C49/73S est effectivement élevée (1g de corps d'inclusion par litre de culture), mais les problèmes se sont présentés lors de la solubilisation qui s'est révélée difficile et a provoqué beaucoup de pertes, et surtout lors de la renaturation des Trx f L C49/73S. Différentes conditions ont été testées, surtout la présence de réducteur (MET ou DTT) pendant les étapes de solubilisation

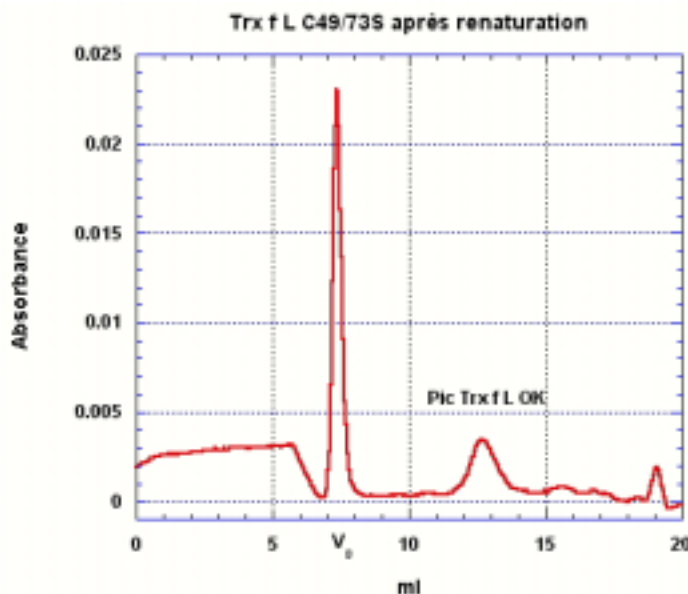


Figure 16. Profil d'élution d'un échantillon de Trx f L C49/73S après renaturation chargé sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex 75.

et/ou de renaturation, mais l'analyse sur colonne de tamisage moléculaire Superdex 75 a montré que la plupart des protéines solubles sont éluées dans le volume d'exclusion V_0 ce qui implique une taille élevée due à la formation de polymères ou, pour le moins, une renaturation incorrecte de la Trx f L (Fig. 16). Finalement, le polissage par échangeuse d'anions (Q-sépharose) a permis d'isoler quelques microgrammes de Trx f L C49/73S sur les 1.5 g du début. Comble de malchance, ces protéines se sont révélées absolument inutilisables à cause de leur instabilité extrêmement élevée qui rend leur congélation et leur manipulation impossible sans voir un floconnement blanc apparaître au moindre choc.

5.1.3 Fructose-1,6-bisphosphatase

L'expression de la FBPase recombinante est élevée dans les cellules BL21 DE3 pLysS (Fig. 17), mais la croissance des bactéries est relativement lente pour une température de 37 °C. Le protocole de purification a été établi en se basant sur le protocole de purification de la FBPase de feuilles d'épinard disponible dans le laboratoire ainsi que sur les travaux de Jacquot et al (Jacquot et al., 1995) pour la FBPase recombinante de pois.

Après avoir cassé les cellules, il est nécessaire de digérer les acides nucléiques afin d'obtenir une solution fluide. L'avantage de l'utilisation de la Benzonase est qu'elle coupe indifféremment l'ARN et l'ADN. Le pH de cette solution est ensuite abaissé à 5.2 ce qui permet de précipiter une partie des protéines tout en conservant la FBPase en solution. Cette étape, qui n'apporte pas beaucoup du point de vue de la purification (Fig. 17), est conservée car elle n'occasionne pas de pertes. Le passage sur la Q-sépharose permet d'obtenir une FBPase relativement propre et qui ne nécessite généralement plus qu'un passage sur une colonne de tamisage (Fig. 17). Toutefois si la séparation sur l'échangeuse d'anions ne présente pas un pic contenant la FBPase bien séparé, il faut ajouter une étape chromatographique supplémentaire en passant la solution sur une colonne d'hydroxyapatite avant le tamisage sur la S-200 (voir Annexe 2).

Le rendement ainsi obtenu est d'environ 30 mg de protéines homogènes par litre de culture pour les FBPases WT, C155S, C174S et C179S alors que le rendement est sensiblement moindre pour les double-mutants (~10 mg/l de culture).

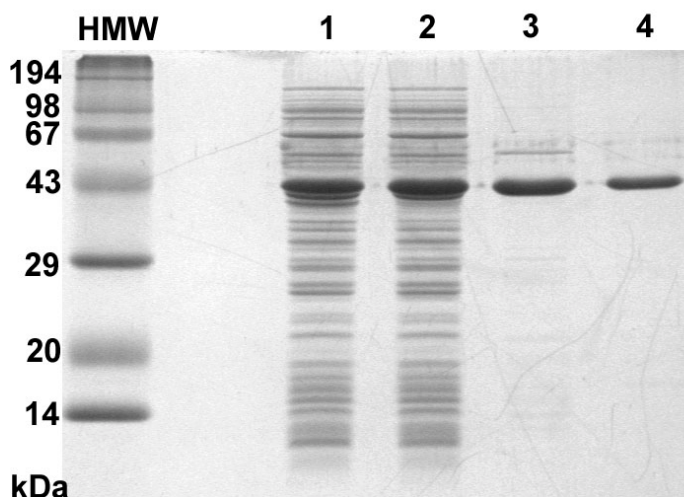


Figure 17. Gel SDS-PAGE présentant les différentes étapes d'une purification de FBPase (FBPaseC155S #4). 1, extrait de protéines totales. 2, après la précipitation acide. 3, après la colonne échangeuse d'anions Q-sépharose. 4, après la colonne de tamisage S-200.

6 RESULTATS ET DISCUSSIONS

6.1 PARTIE III: COMPARAISON DE LA FBPASE WT NATIVE ET RECOMBINANTE

Le comportement de la FBPase recombinante a été comparé à celui de la FBPase isolée de feuilles d'épinard afin de s'assurer que la protéine produite dans les bactéries est similaire à la forme native.

6.1.1 Séparation sur gel SDS

Une quantité égale, basée sur l'absorbance à 280 nm, de FBPase recombinante et de FBPase isolée de feuille d'épinard a été chargée sur un gel SDS-page (Fig. 18). La migration des monomères de FBPase est égale, à une taille de ~43 kDa. L'homogénéité des deux préparations est élevée, elles ne présentent pas de traces de contaminants de poids moléculaire différents.

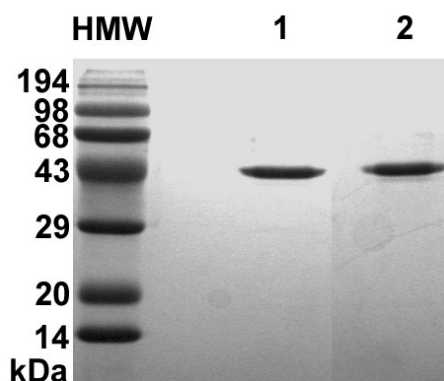


Figure 18. Séparation sur SDS-PAGE de la FBPase native (1) et recombinante (2). L'absorbance à 280 nm des deux préparations de protéines a été ajustée à 0.3 cm^{-1} , puis une quantité correspondant à $\sim 3 \mu\text{g}$ de protéines a été chargée sur le gel.

6.1.2 Cinétique d'activation par la Trx f

Afin de pouvoir comparer les deux FBPases, elles ont été diluées pour obtenir une absorbance à 280 nm équivalente comme ci-dessus.

Les cinétiques d'activation des FBPase ont été réalisées avec une concentration de Trx f dans le mélange d'activation de $2 \mu\text{M}$ finale (Fig. 19).

Les deux courbes d'activation par la Trx f sont similaires bien que la protéine native présente une activité maximale supérieure de 10 % à celle de la recombinante.

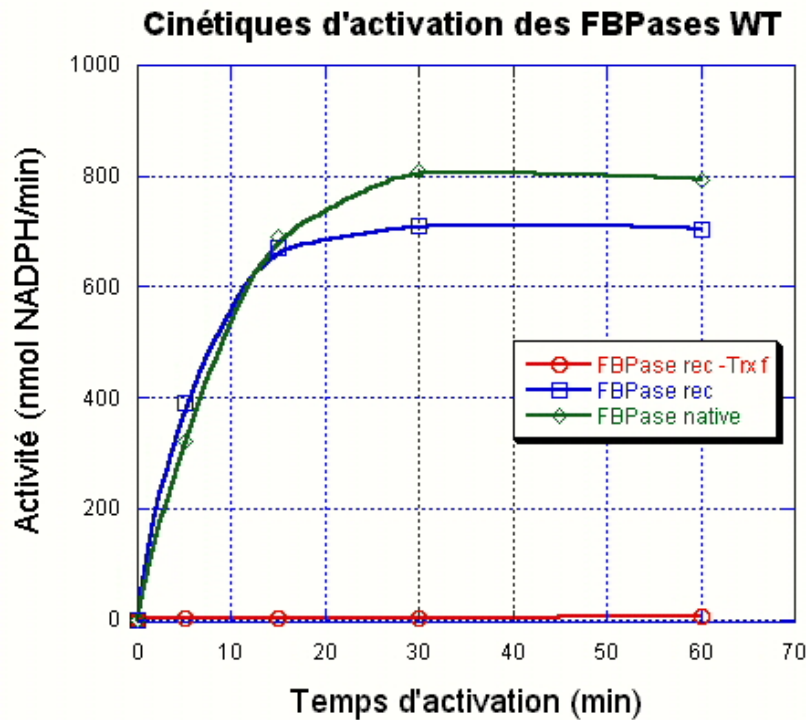


Figure 19. Comparaison des cinétiques d'activation de la FBPase recombinante (bleu) et native (vert). L'activation de la FBPase avec le DTT seul est pratiquement nulle (rouge). Des quantités égales de FBPase, basées sur l'absorbance à 280 nm, sont utilisées. L'activation est faite en présence de 2 μ M Trx f.

6.1.3 Analyse de la FBPase recombinante par tamisage sur Superose 12

La FBPase native est sous la forme d'un homotétramère, mais des expériences ont démontré qu'elle peut se dissocier en homodimère à des pH alcalins (Zimmermann et al., 1976; Buc et al., 1980; Ballicora & Wolosiuk, 1990). Le passage sur une colonne de tamisage Superose 12 permet de s'assurer que la FBPase produite dans les bactéries est bien sous la forme d'un tétramère (Fig. 20). Le volume d'élution obtenu de 12 ml permet de calculer le poids moléculaire (M_r) de la FBPase recombinante grâce à une courbe de calibration. Le M_r obtenu est de 140 kDa, soit un peu moins que les 160 kDa calculés avec la composition en acides aminés, mais la séparation sur colonne de tamisage est tributaire de la forme de la protéine ce qui explique cette légère différence.

Le profil d'élution présente un petit pic avec un V_e de 10.35 ml qui correspond à un poids moléculaire de \sim 300 kDa. Un test d'activité effectué sur une fraction de ce pic a démontré qu'il s'agit de FBPase. De plus l'analyse sur gel SDS-PAGE permet de confirmer la présence de FBPase dans ce pic (Fig. 21). Un échantillon chargé sur le gel en absence de MET montre une faible bande de poids moléculaire de \sim 100 kDa qui est absente de l'échantillon réduit. Il s'agit certainement de dimères covalents formés entre deux sous-unités de FBPase appartenant à deux tétramères différents, qui en solution formeraient des complexes d'octamères d'une taille avoisinant les 300 kDa.

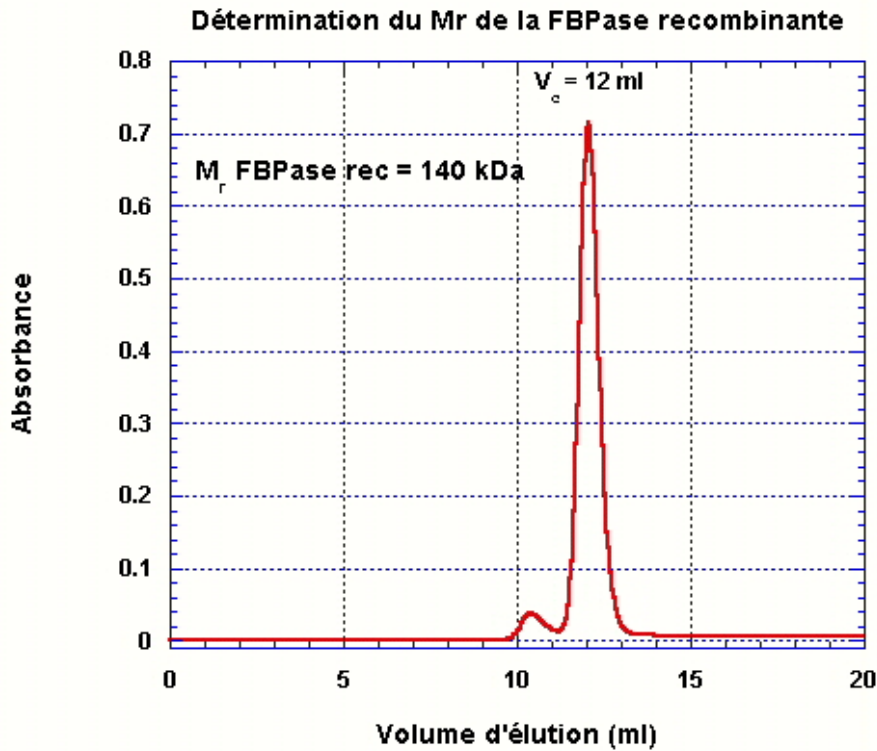


Figure 20. Analyse de la taille de la FBPase recombinante sur une colonne de tamisage moléculaire Superose-12. 0.5 mg de FBPase sont séparés sur la colonne dans du tampon 50 mM Na-Acétate pH 5.5 + 50 mM NaCl.

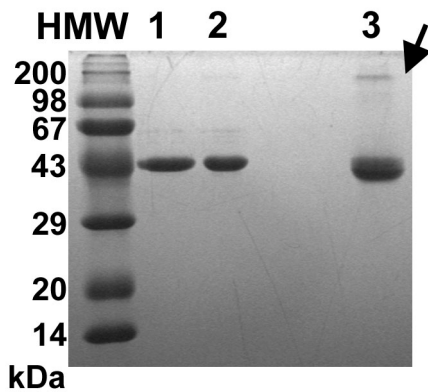


Figure 21. Analyse sur gel SDS-PAGE d'échantillons des deux pics de la séparation sur la Superose-12.
1: échantillon du pic principal. 2: échantillon du pic de $V_e = 10.4$ ml en présence de MET. 3: échantillon identique, mais en absence de réducteur.
La flèche montre la bande de M_r élevé (> 100 kDa).

6.1.4 Détermination du coefficient d'extinction molaire de la FBPase WT

Les protéines dialysées dans le tampon volatile formiate d'ammonium ont été réparties à raison de ~3 mg de protéines par tubes Eppendorf tarés. Après la lyophilisation, trois pesées ont été faites dont la moyenne est présentée dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	mg de protéines/300 μ l	mg/ml
1	3.07	10.2
2	3.05	10.2
3	3.1	10.3
4	3,1	10.3
5	3.07	10.2
Moyenne		10.24

Le spectre UV de la solution de protéines a établi une absorbance à 279 nm de :
 $A_{279\text{ nm}} = 9.39\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 22)

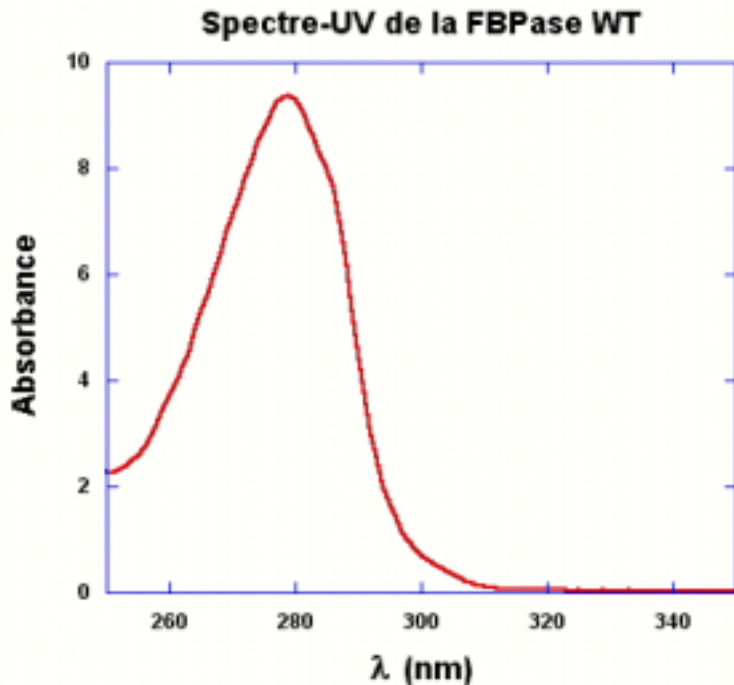


Figure 22. Spectre UV de la FBPase recombinante WT dans le tampon 20 mM formiate d'ammonium pH 5.8 avant la lyophilisation. L'absorbance est donnée pour une cuvette de 1 cm. La référence a été réalisée avec le même tampon.

Le calcul du poids moléculaire du tétramère de FBPase recombinante (y-compris la méthionine initiatrice) donne:

$$\underline{M_r = 157\,300\text{ gr.mol}^{-1}}$$

Ce qui permet de calculer le coefficient d'extinction molaire avec la formule suivante:

$$\epsilon_{279\text{nm}} = M_r (\text{gr.mol}^{-1}) * A (\text{cm}^{-1}) / C (\text{gr.l}^{-1}) = 157\,300 * 9.39 / 10.24 = 144\,243\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Afin de simplifier et compte tenu des erreurs inévitables avec ce type de mesures, ce coefficient peut être arrondi:

$$\epsilon_{279\text{nm}} = \underline{\underline{144\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}}}$$

Cette valeur est proche de celle calculée par le programme ProtParam du serveur ExPASy qui fournit le coefficient suivant pour la FBPase WT en assumant que toutes les cystéines sont sous forme réduite :

$$\epsilon_{279\text{nm}} \text{ calculé} = \underline{\underline{147\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}}}$$

6.1.5 Détermination du potentiel d'oxydoréduction de la FBPase WT

Les potentiels redox de la FBPase WT recombinante ont été mesurés à des pH allant de 5.5 à 8.5. Les valeurs E_m obtenues présentent la pente de -59 mV/unité de pH attendue pour une réaction redox impliquant la prise de deux protons pour deux électrons transférés (Fig. 23). Des titrations de la FBPase isolée de feuilles d'épinard (native) ont été effectuées à pH 6.0 et 7.0 à titre comparatif. Les résultats obtenus correspondent aux valeurs mesurées avec la FBPase recombinante.

L' E_m obtenu pour le pH 7.0 est de $-305 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ (Fig. 24), alors que de précédentes mesures établissaient le potentiel à pH 7.0 de la FBPase chloroplastique d'épinard à $-330 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ (Hirasawa et al., 1999). Cette différence est vraisemblablement due à la FBPase utilisée précédemment, car la valeur de -305 mV a été confirmée par d'autres groupes de recherches (Knaff, 2000). Ce potentiel est de 15 mV plus négatif que celui de la Trx f (-290 mV , (Hirasawa et al., 1999)) ce qui défavorise le transfert des électrons de la Trx f vers la FBPase. Ce barrage permet au système chloroplastique de se prémunir contre des activations trop rapides des enzymes du cycle de Calvin et d'éviter une consommation d'énergie alors que la photosynthèse n'est pas optimale. La proportion de Trx f réduite doit être élevée pour déplacer l'équilibre de cette réaction redox vers une activation de la FBPase, ce qui sous-entend un flux d'électrons dans la chaîne photosynthétique important.

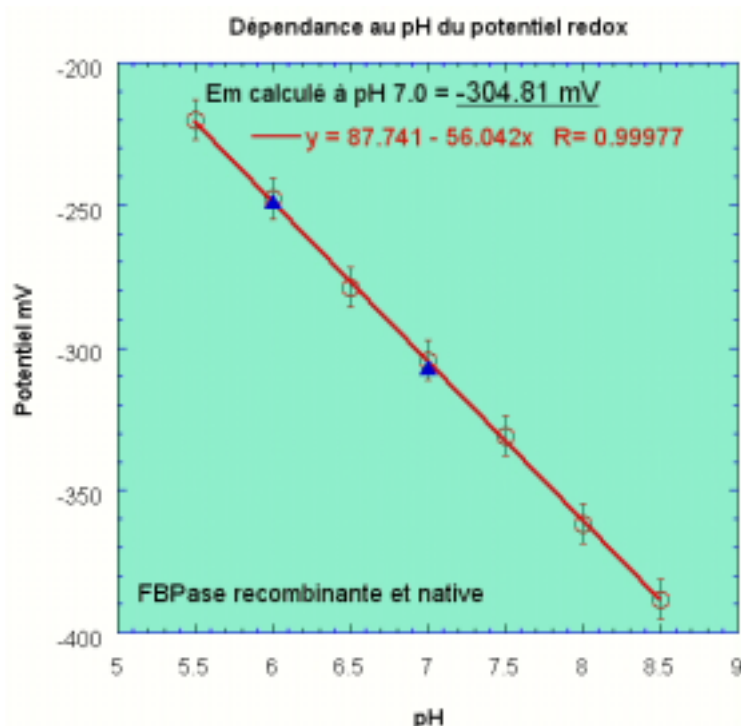


Figure 23. Dépendance au pH. Les potentiels de la FBPase WT sont représentés en fonction du pH. La droite formée a une pente de -56 mV/unité de pH, ce qui est proche de la valeur théorique de -59 mV/unité de pH. Les cercles sont les mesures effectuées avec la FBPase recombinante, les triangles avec la FBPase isolée de feuilles d'épinard.

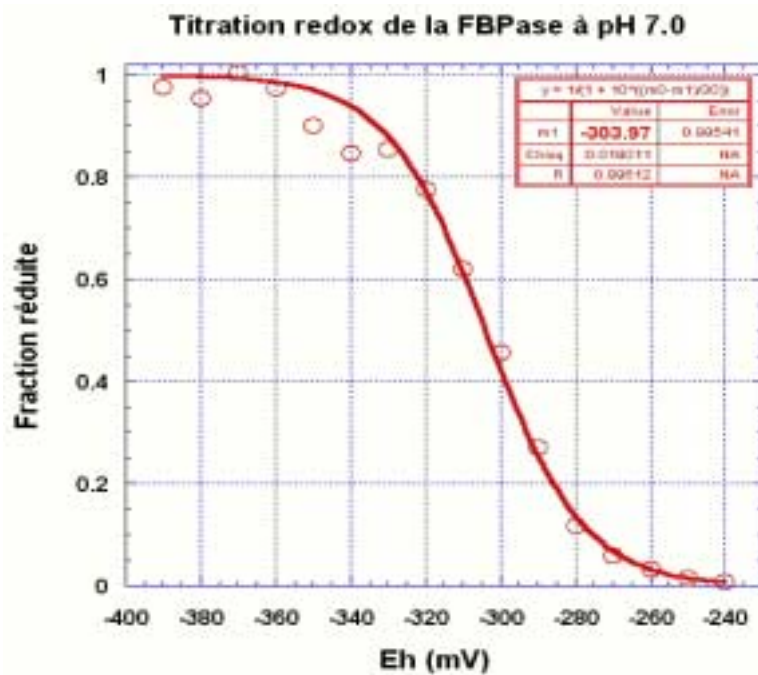


Figure 24. Titration à pH 7.0. Moyenne de 4 mesures effectuées avec la FBPase recombinante. La valeur de 1 sur l'ordonnée correspond à l'activité maximale mesurée (FBPase complètement réduite).

6.1.6 Résumé

Le comportement de la FBPase WT recombinante ne présente pas de notables différences avec celui de la protéine native. Il faut cependant souligner que la protéine recombinante semble légèrement moins stable d'un point de vue mécanique. Une agitation prolongée entraîne une diminution de l'activité mesurée. Ce phénomène est peut être lié à des modifications subies par la FBPase dans le chloroplaste qui n'ont pas lieu dans *E.coli*, bien qu'aucune mention à ce sujet ne se trouve dans la littérature.

7 RESULTATS ET DISCUSSIONS

7.1 PARTIE IV: CARACTERISATION DES FBPASES RECOMBINANTES WT ET MUTANTES

7.1.1 Cinétiques d'activation

L'activation de la FBPase par réduction a été établie en utilisant la Trx f, qui est connue comme la protéine interagissant avec la FBPase in vivo, à deux concentrations différentes, les mutants Trx f C49S et C49/73S, qui ne possèdent plus la cystéine interne du site actif, ainsi que la Trx m connue pour être incapable d'activer la FBPase.

La figure 25 présente les résultats des cinétiques d'activation des FBPASES obtenues avec ces différentes thiorédoxines. Pour une meilleure lisibilité l'activité maximale obtenue est utilisée comme 100%.

7.1.1.1 FBPase WT

Seule la Trx f a la possibilité d'activer significativement la FBPase WT et ce à une concentration de 2 μM , alors qu'une concentration de 0.2 μM est beaucoup moins efficace. Les Trx f C49S, C49/73S ainsi que la Trx m à une concentration de 2 μM ne présentent pas une activation supérieure à celle obtenue avec le DTT seul (Fig. 25a). Il est nécessaire d'augmenter considérablement la concentration de la Trx f C49S (Fig. 26) pour obtenir une activation de la FBPase WT. La Trx f C49/73S à une concentration de 10 μM reste toujours sans effet.

7.1.1.2 FBPase C179S

La FBPase C179S est un mutant qui devrait se comporter de façon très similaire à la FBPase WT, car la Cys179 n'est pas impliquée dans le disulfure permettant la régulation par la Trx f.

L'activation de la FBPase C179S par la Trx f est extrêmement rapide, le temps d'agiter le tube contenant le mélange d'activation avec 2 μM de Trx f puis de prélever un échantillon pour le tester dans le mélange réactionnel suffit pour obtenir une activité proche de la vitesse maximale. Une concentration de 0.2 μM de Trx f permet cependant de mettre en évidence la cinétique d'activation. De plus, la Trx f C49S à 2 μM est également capable de significativement activer la FBPase C179S, alors que la Trx f C49/73S et la Trx m présentent une cinétique d'activation linéaire, mais nettement plus accentuée que le DTT seul (Fig. 25b).

7.1.1.3 FBPase C155S

La mutation de la Cys155 par une sérine rend cette FBPase constitutivement active en rendant la formation du pont disulfure de régulation impossible. Son comportement est semblable à la FBPase WT réduite. Les cinétiques d'activation de la FBPase C155S (Fig. 25c) démontrent que l'activité est totalement indépendante des Trx ou d'un agent réducteur.

7.1.1.4 FBPase C174S

La Cys174 est la deuxième cystéine impliquée dans le pont disulfure permettant la régulation de la FBPase par la Trx f, mais des études précédentes réalisées sur la FBPase chloroplastique de petit pois (Jacquot et al., 1997) ont montré que le comportement de ce mutant C174S (C173S chez le pois) diffère considérablement de celui de la FBPase C155S. Les cinétiques d'activation obtenues avec la FBPase C174S d'épinard confirment les résultats précédemment publiés, mais mettent également en évidence l'importance des conditions de préparation et de stockage de cette protéine.

Les cinétiques d'activation de la FBPase C174S (Fig. 25d) en absence de DTT et de Trx présentent une activité stable et élevée (~40 % de l'activité maximale). Cependant, cette activité basale varie suivant la durée et les conditions de stockage. Si la solution de FBPase C174S est fraîchement purifiée ou a été conservée sous azote, l'activité de base est proche des 90 % et le profil des cinétiques d'activation est semblable à la FBPase C155S, alors que la même protéine incubée en présence d'air va voir son activité de base décroître rapidement.

L'activité maximale est rapidement atteinte en présence de Trx f réduite, alors que les Trx f mutantes ainsi que la Trx m n'activent pas la FBPase C174S beaucoup plus efficacement que le DTT seul.

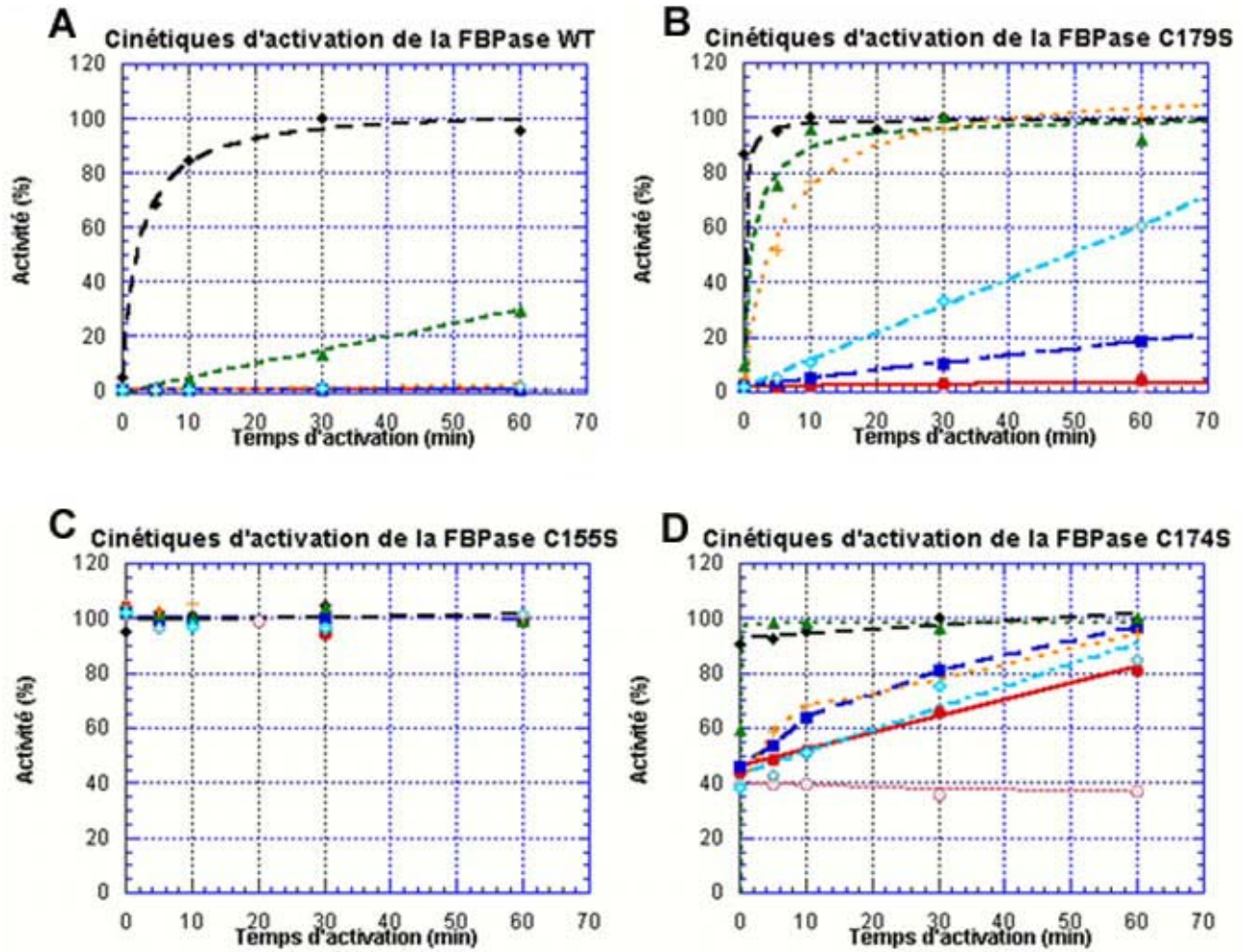


Figure 25. Cinétiques d'activation. Les mélanges d'activation contiennent tous du tampon et la FBPs: o contrôle (mauve), ● + DTT (rouge), ◆ + DTT et 2 μ M Trx f (noir), ▲ + DTT et 0.2 μ M Trx f (vert), ■ + DTT et 2 μ M Trx m (bleu), + + DTT et 2 μ M Trx f C49S (orange), ◇ + DTT et 2 μ M Trx f C49/73S (bleu clair).

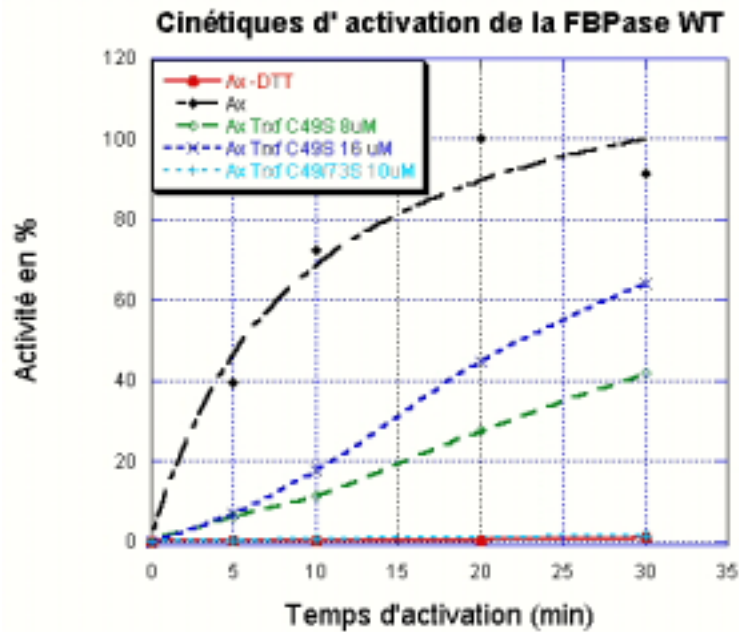


Figure 26. Cinétiques d'activation de la FBPase WT par les mutants de la Trx f. ● mélange réactionnel (Ax) sans DTT (rouge), ◆ Ax avec 2µM Trx f (noir), ◇ Ax avec 8 µM Trx f C49S (vert), x Ax avec 16 µM Trx f C49S (bleu), + Ax avec 10 µM Trx f C49/73S (bleu clair).

7.1.2 Activité en fonction du magnésium

Le site catalytique de la FBPase nécessite la présence de Mg^{2+} pour scinder le fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate et un phosphate inorganique. De plus il est possible de provoquer l'activation de la FBPase oxydée en augmentant la concentration de magnésium (Gardemann et al., 1986). Afin de définir le besoin des différentes FBPases en Mg^{2+} , des tests d'activité ont été fait avec des concentrations croissantes de Mg^{2+} . Les courbes d'activité obtenues sont des sigmoïdes et concordent avec l'équation de Hill simplifiée (Geck & Hartman, 2000).

La FBPase WT oxydée (inactive) présente un $S_{0.5}$ pour le magnésium de 12.2 mM alors que la forme réduite (active) a une valeur de 0.5 mM (Fig. 27a).

L'influence du magnésium sur l'activité de la FBPase C179S présente un stade intermédiaire par rapport à la protéine WT (Fig. 27b). D'une part la forme oxydée présente un $S_{0.5}$ de 3 mM et de l'autre la forme réduite un $S_{0.5}$ de 1 mM.

Le $S_{0.5}$ obtenu pour la dépendance au Mg^{2+} de la FBPase C155S est de 0.5 mM sans différence significative entre la forme oxydée et celle mise en présence de Trx f réduites (Fig. 27c).

L'effet du Mg^{2+} sur la FBPase C174S est tributaire de la qualité de la préparation de la protéine. Si celle-ci est récente, le $S_{0.5}$ mesuré est inférieur à 1 mM Mg^{2+} pour la forme réduite et oxydée (Fig. 27d), alors que le $S_{0.5}$ de la FBPase C174S oxydée pour le magnésium augmente parallèlement à la durée de stockage de la protéine en présence d'air.

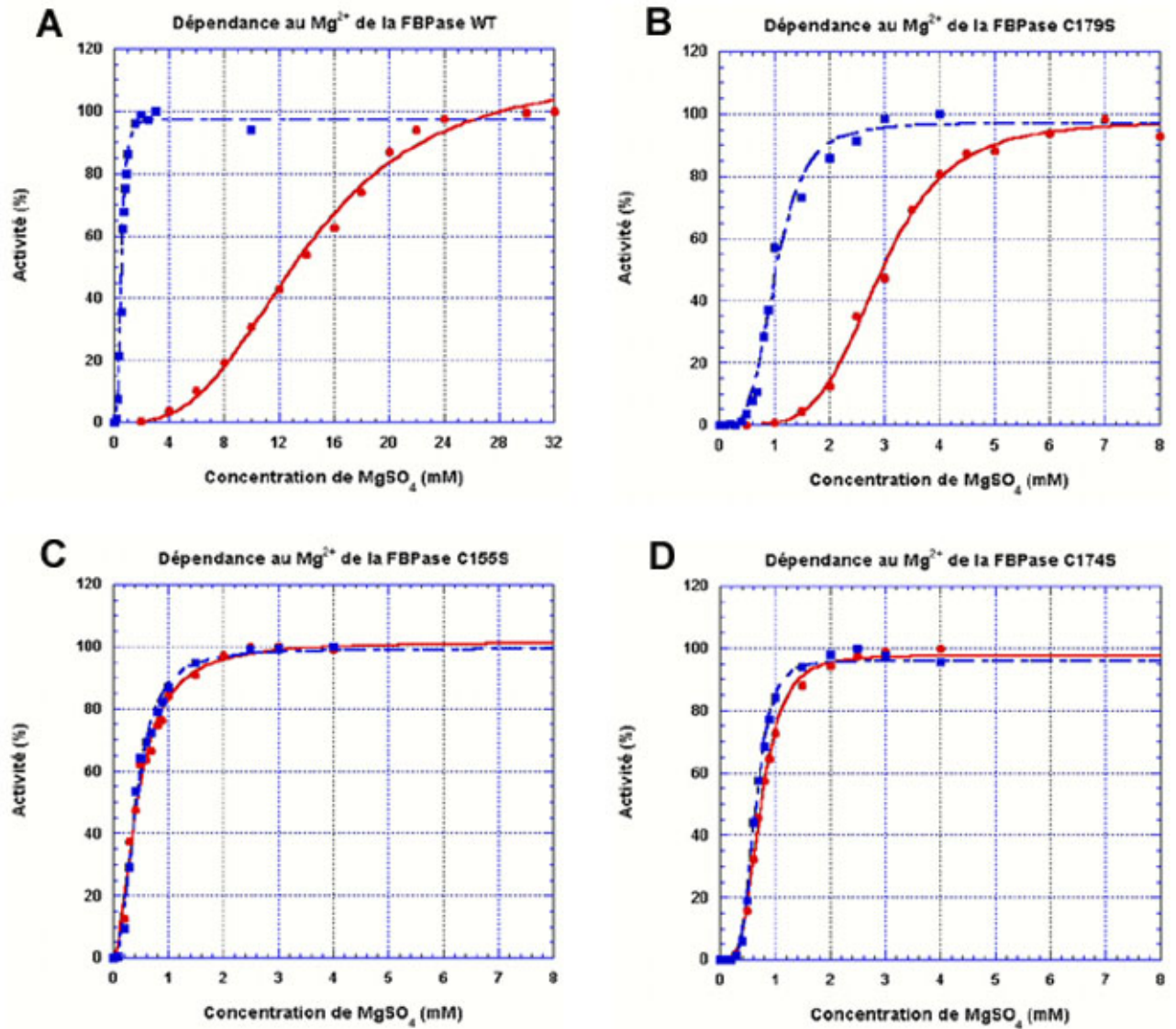


Figure 27. Dépendance au Mg^{2+} des différentes FBPAses. L'activité est établie dans un mélange réactionnel à pH 7.9 en fonction de la concentration de magnésium de ce milieu. Les FBPAses oxydées (sans activation par la Trx f) sont en rouge (●) et les protéines réduites (activée) en bleu (■).

Le tableau ci-dessous présente les valeurs $S_{0.5}$ calculées d'après les courbes et avec l'équation de Hill.

FBPase	$S_{0.5}$ (mM $MgSO_4$) Oxydée	$S_{0.5}$ (mM $MgSO_4$) Réduite
WT	12.2	0.5
C155S	0.5	0.45
C174S	0.74 (1.2*)	0.6
C179S	3.2	1.2
C155/174S	0.7	ND
C155/179S	1.5	ND
C174/179S	1.3	ND

* FBPase C174S stockée en présence d'air

La figure 28 présente l'ensemble des tests d'activité en fonction de la concentration de magnésium et met en évidence quatre principales sigmoïdes groupant les différentes FBPases réduites et oxydées. La FBPase WT ox se démarque par un $S_{0.5}$ très élevé, suivi par la FBPase C179S ox. Puis la courbe suivante est une moyenne de l'activité de la FBPase C179S red et des double-mutants FBPase Cx/179S ox/red. La dernière sigmoïde comprend la FBPase WT red ainsi que les mutants C155S ox/red, C174S ox/red et C155/174S ox/red et a un $S_{0.5}$ moyen de 0.6 mM.

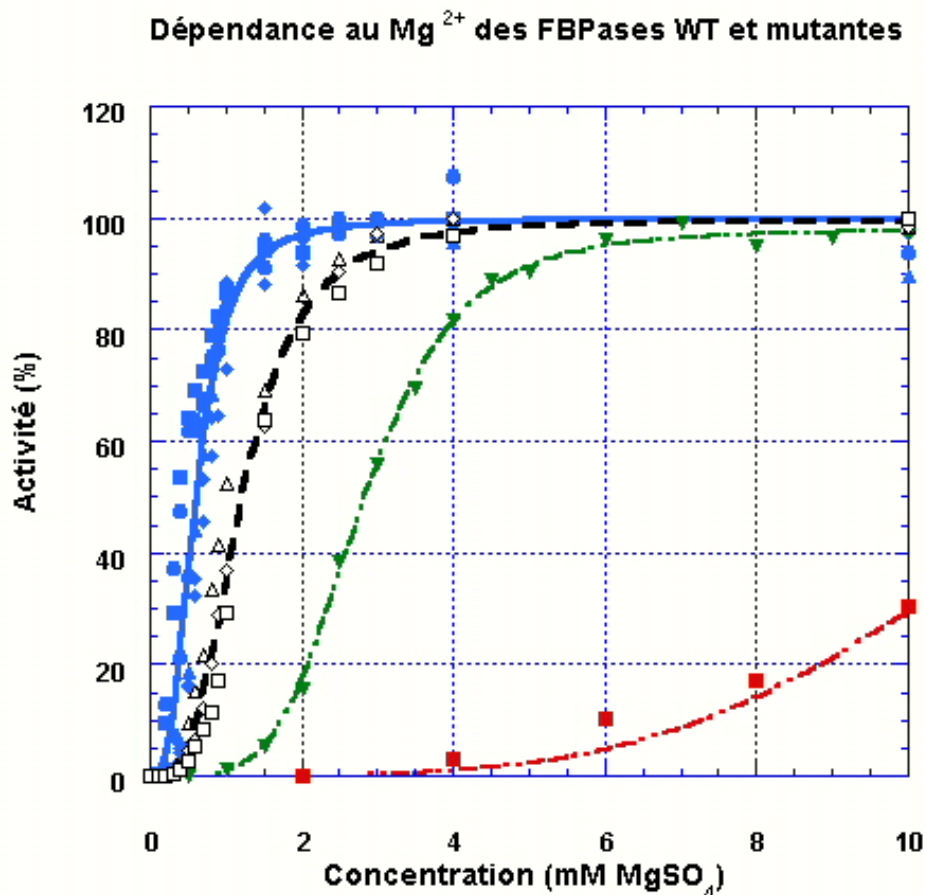


Figure 28. Activité en fonction du Mg^{2+} . En rouge la FBPase WT_{ox} (■), en vert la FBPase C179S_{ox} (▼), en noir la moyenne des courbes obtenues pour les FBPases C179S_{red} et Cx/179S (symboles creux) et en bleu la moyenne des activités obtenues avec les FBPases WT_{red}, C155S_{ox/red}, C174S_{ox/red} et C155/174S (symboles pleins).

7.1.3 Dosage des groupements thiols libres

Le dosage des thiols libres avec le réactif d'Ellman (DTNB) permet de quantifier les cystéines libres accessibles à la surface de la protéine ainsi que la quantité totale de groupes -SH de la protéine dénaturée avec un détergent (SDS).

La FBPase WT possède 7 Cys par sous-unités dont deux sont impliquées dans un pont disulfure.

Le tableau ci-dessous présente le nombre de groupes thiols par sous-unité de FBPase.

FBPase	-SH totaux	-SH en surface
WT	5	0
C155S	6	ND
C174S	5.7	ND
C179S	4	0

Les quantités de thiols libres obtenues correspondent avec les données connues. La FBPase WT comprend 7 cystéines totales, mais deux sont impliquées dans le pont disulfure. Ce pont n'est pas formé chez les mutants C155S et C174S où les 6 cystéines restantes sont libres, alors que la mutation de la Cys179 laisse 4 cystéines libres sur les 6 conservées par ce mutant.

La FBPase WT et C179S n'ont pas de cystéines libres accessibles et il s'est avéré impossible de quantifier celles des deux autres mutants, la quantité de TNB⁻ libérée ne se stabilisant pas dans le temps comme si ces deux protéines se déroulaient progressivement, rendant accessible de nouvelles cystéines. A titre d'information, les valeurs mesurées après un temps d'incubation de 15 minutes se situent dans une fourchette de 0.5 à 1.6 -SH/S.U. pour les deux protéines.

Il est important de noter que tous ces dosages ont été réalisés à partir de préparation de protéines fraîchement purifiées, en effet seule la FBPase WT et la FBPase C179S présentent une quantité de thiols libres stable après stockage. A l'inverse la quantité de -SH totaux des FBPases C155S et C174S diminue lors du stockage pour se stabiliser aux alentours de 4 -SH/S.U. pour la FBPase C174S et encore moins pour le mutant C155S. Cette chute de la quantité de thiols libres peut être due soit à la formation de ponts disulfures artefactuels, la mutation introduite déstabilisant suffisamment la structure pour que deux cystéines se rapprochent assez, ou par thioesterisation de groupements thiols avec l'acétate du tampon voire avec un résidu acide de la chaîne polypeptidique, bien que cette réaction soit nettement moins évidente.

7.1.4 Dichroïsme circulaire

La comparaison de la FBPase WT et des mutants par dichroïsme circulaire permet, après analyse informatique, de mettre en évidence des différences au niveau de la structure secondaire (Yang et al., 1993). Les spectres des FBPases WT et des simples mutants sont semblables si les protéines utilisées ont été récemment purifiées et conservées sous argon, alors que pour les mêmes protéines stockées en

présence d'air, le spectre de la FBPase C155S diverge sensiblement des autres (Fig. 29). L'analyse de ces spectres par le programme CDDeconvolution montre que cette différence semble être due à un contenu en hélice α pour la FBPase C155S d'environ 3 % inférieur à celui de la FBPase WT.

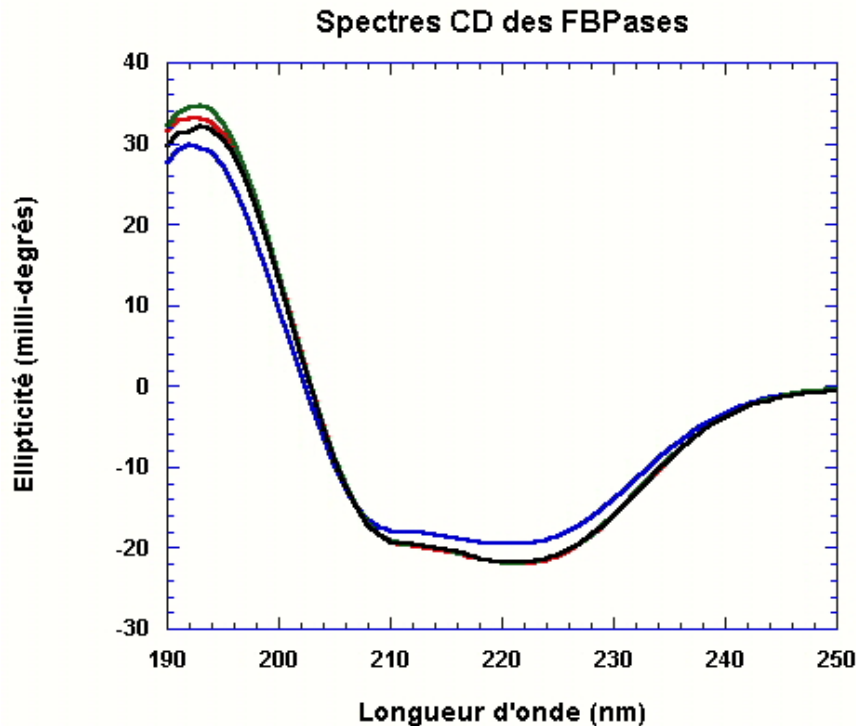


Figure 29. Spectres de dichroïsme circulaire des FBPases WT (rouge), C179S (noir), C174S (vert) et C155S (bleu) conservée 2 semaines à -20 °C en présence d'air. La concentration des protéines est de 1.5 μ M dans un tampon phosphate.

Tableau présentant l'analyse de la structure secondaire d'après les spectres CD.

FBPase WT					
	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Helix	33.20 %	32.70 %	33.60 %	33.10 %	<u>33.80 %</u>
Antiparallèle	7.20 %	8.60 %	8.10 %	7.90 %	8.10 %
Parallèle	9.10 %	9.10 %	9.00 %	9.10 %	8.60 %
Beta-Turn	16.50 %	16.60 %	16.50 %	16.60 %	16.70 %
Rndm. Coil	35.60 %	35.20 %	34.30 %	33.70 %	32.80 %
Total Sum	101.50 %	102.30 %	101.40 %	100.40 %	99.90 %
FBPase C155S					
	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Helix	30.90 %	30.20 %	30.60 %	30.60 %	<u>30.60 %</u>
Antiparallèle	9.60 %	10.30 %	9.10 %	8.50 %	9.00 %
Parallèle	9.30 %	9.60%	9.70 %	9.90 %	9.30 %
Beta-Turn	17.10 %	17.20 %	17.10 %	17.10 %	17.30 %
Rndm. Coil	35.40 %	35.70 %	35.70 %	35.50 %	35.00 %
Total Sum	102.30 %	103.10 %	102.20 %	101.50 %	101.30 %

Remarque: les valeurs les plus précises sont celles où la somme totale des différentes structures secondaires s'approche le plus de 100 %.

7.1.5 Détermination du potentiel d'oxydoréduction de la FBPase C179S

La détermination du potentiel redox de la FBPase C179S a nécessité la diminution de la concentration de magnésium dans le milieu réactionnel car à 10 mM (Hirasawa et al., 1999) le mutant oxydé est actif à 100% (Fig. 27b), c'est pourquoi la concentration de Mg^{2+} a été réduite à 1.5 mM.

Le potentiel redox de la FBPase C179S n'a pu être mesuré que dans l'intervalle de pH de 5.5 à 7.0 où la pente obtenue est celle de -59 mV par unité de pH attendue (Fig. 30). La valeur E_m obtenue pour le pH 7.0 est de $-290 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$.

Des pH plus alcalins n'ont pas donné des valeurs utilisables à cause de l'instabilité élevée de ce mutant à ces pH.

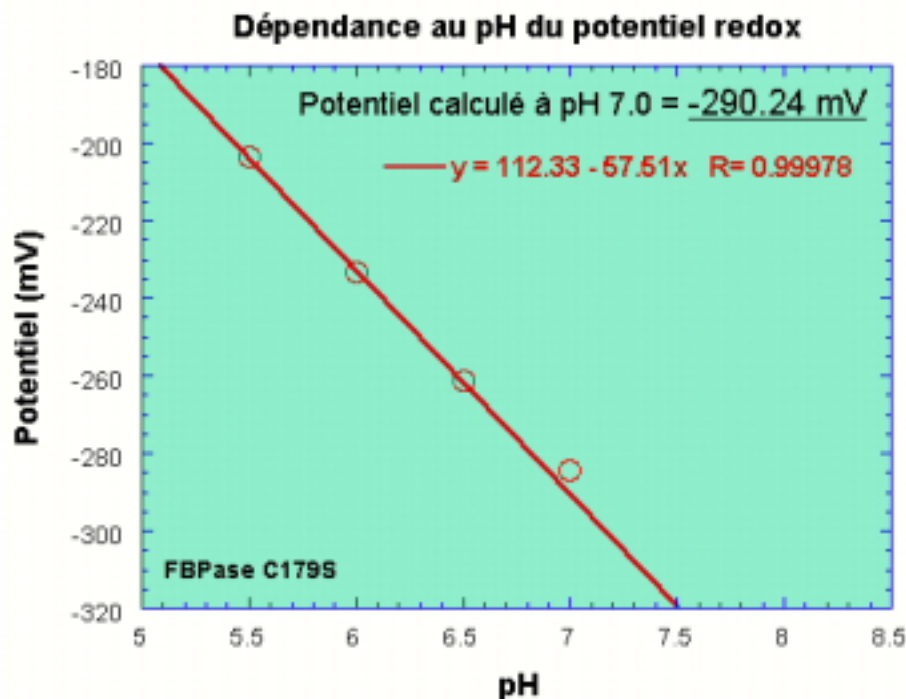


Figure 30.

Dépendance au pH. Les potentiels de la FBPase C179S sont représentés en fonction du pH. La droite formée a une pente de -57 mV/unité de pH, proche de la valeur théorique de -59 mV/unité de pH.

7.1.6 Discussion

7.1.6.1 FBPase WT

Les cinétiques d'activation montrent clairement que le pont disulfure de régulation de la FBPase WT est spécifiquement clivé par la Trx f réduite, mais à une concentration relativement élevée (2 μM) alors qu'une concentration dix fois moindre produit une activation beaucoup plus lente. Ce résultat est à mettre en corrélation avec les potentiels redox des deux protéines (Chapitre 6). La différence de -15 mV du

potentiel de la FBPase WT par rapport à celui de la Trx f empêche une activation prématurée de la FBPase.

Le fonctionnement de la FBPase réduite nécessite la présence de Mg^{2+} , afin de pouvoir cliver le fructose-1,6-bisphosphate, à une concentration supérieure à 1 mM. Il est également possible d'activer la FBPase WT oxydée avec un excès de magnésium, mais la concentration nécessaire (~20 mM) n'est certainement pas présente dans le stroma des chloroplastes car il est généralement admis que la majeure partie du magnésium présent dans les chloroplastes est fixée. Lors de l'illumination de chloroplastes, une augmentation de la concentration de Mg^{2+} dans le stroma de 1 à 3 mM a été observée (Portis & Heldt, 1976; Lakey & Pattus, 1989) et est due au flux du magnésium présent dans les thylacoïdes vers le stroma afin de contrebalancer la formation du gradient de protons.

La régulation de l'activité de la FBPase se fait donc à deux niveaux. D'une part l'activation de la FBPase est directement liée au flux photosynthétique par le système ferrédoxine-thiorédoxine réductase qui doit produire une proportion de Trx f réduites suffisamment importante pour que l'activation soit significative. De l'autre, l'activité de la FBPase réduite peut être modulée par la concentration de Mg^{2+} présente dans le stroma ainsi que par le pH (Gardemann et al., 1986) qui varient selon l'état photosynthétique de la plante.

7.1.6.2 Mutation de la Cys179

La FBPase C179S a un comportement similaire à la FBPase WT car cette cystéine n'est pas impliquée dans le pont disulfure de régulation. Cependant elle est remarquablement conservée dans toutes les séquences amino-acidiques connues de FBPases chloroplastiques.

Il est intéressant de remarquer que le remplacement de la Cys179 par une sérine rend la FBPase plus aisément activable par réduction par la Trx f ainsi que par les mutants de la Trx f, mais que la réduction par la Trx m n'est pas grandement améliorée. Le potentiel d'oxydoréduction plus positif de 15 mV (-290 mV) explique pourquoi la Trx f active plus facilement la FBPase C179S car le barrage dû à la différence de potentiel entre les deux protéines est éliminé. Les mutants Trx f C49S et C49/73S conservent la spécificité qui fait défaut à la Trx m et peuvent attaquer le pont disulfure de la FBPase et former un complexe transitoire FBPase-Trx f puis cette hétérodisulfure peut être réduit par le DTT présent dans le milieu d'activation régénérant la population de Trx f mutantes. Cependant ce phénomène n'intervient pas ou peu avec la FBPase WT, ce qui tend à démontrer que la mutation de la Cys179 perturbe la conformation de l'insertion permettant la régulation redox de la FBPase. Cette modification, même mineure, autorise la réduction de l'hétérodisulfure entre la FBPase C179S et la Trx f C49S par le DTT.

La dépendance au magnésium tend également à attribuer un rôle structural à la Cys179, le $S_{0.5}$ mesuré pour la FBPase C179S est de 3 mM et est nettement inférieur à celui de la FBPase WT. La perturbation structurale engendrée dans l'insertion par la mutation en Ser179 semble être susceptible de déstabiliser le blocage du site de fixation du Mg^{2+} dans le site catalytique. A l'inverse, la FBPase C179S réduite ainsi que les FBPase Cx/179S présentent un $S_{0.5}$ pour le Mg^{2+} plus élevé que la forme active FBPase C155S ou que les autres formes réduites suggérant que la réduction du pont disulfure ne permet pas une libération optimale du site catalytique de la FBPase C179S.

7.1.6.3 Mutation de la Cys155

La mutation de la Cys155 produit une FBPase constitutivement active dont le comportement correspond à la FBPase WT réduite. La structure tridimensionnelle du mutant équivalent pour la FBPase de petit pois (C153S) a été résolue par cristallographie (Chiadmi et al., 1999) et ne présente pas de différences avec celle de la forme WT oxydée au niveau du site actif ce qui permet aux auteurs de suggérer que ce mutant est susceptible d'adopter la conformation inactive et que le pont disulfure entre la Cys153 et la Cys173 (155 et 174 chez l'épinard) sert principalement à stabiliser cette forme inactive. Il est possible d'imaginer alors que c'est la présence de substrats et/ou de Mg^{2+} qui provoque le changement conformationnel libérant le site actif.

La FBPase C155S semble être sensible à des oxydants tel que l'oxygène, qui provoquent une diminution de la quantité de thiols libres totaux par sous-unité qui pourrait se traduire par la formation de ponts disulfures artefactuels. Cette réaction pourrait être facilitée par la grande flexibilité de la boucle formée par l'insertion et par l'absence de la stabilité conférée par le pont entre les Cys155 et 174.

Cette hypothèse est renforcée par l'analyse des spectres CD qui permet de mettre en évidence des variations de la structure secondaire. Si les spectres de la FBPase WT et des trois mutants sont semblables avec des préparations de protéines récentes, une solution de FBPase C155S conservée en présence d'air présente un spectre divergeant des autres et l'analyse de la composition des structures secondaires montre une perte de ~3 % du contenu en hélice α de la FBPase C155S par rapport à la FBPase WT. Ce pourcentage correspond également à l'hélice formée au niveau de l'insertion et qui contient les Cys174 et 179. Il est possible que la boucle flexible se stabilise en formant un pont disulfure entre les deux cystéines restantes ce qui détruit la portion d'hélice α comprise entre l'Ala169 et la Val178.

7.1.6.4 Mutation de la Cys174

La mutation de la Cys174 en sérine rend la FBPase active de la même manière que la FBPase C155S mais ce comportement est observable seulement avec une solution de protéines fraîchement extraites des bactéries. Plus l'exposition à l'air se prolonge, plus un semblant de régulation réapparaît comme les cinétiques d'activation le montrent. La réactivation est possible avec la Trx f réduite, mais également avec le DTT seul bien que dans une moindre mesure, ce qui démontre que cette réduction n'est pas aussi spécifique que pour la FBPase WT.

L'analyse de la structure de la FBPase de petit pois permet aux auteurs (Chiadmi et al., 1999) d'expliquer ce phénomène par la formation d'un pont disulfure artefactuel entre la Cys153 et 178 (Cys155 et 179 chez l'épinard). En effet la Cys153 se trouve face aux Cys173 et Cys178. En cas d'absence de la Cys173, un très léger déplacement permettrait de suffisamment rapprocher les Cys153 et 178 pour former le pont disulfure artefactuel.

Cette hypothèse correspond aux résultats observés avec la FBPase C174S où la quantité totale de thiols libres passe de ~6 par sous-unités à 4 en quelques jours si la solution protéique est exposée à l'air. De plus, si l'on fait réagir les -SH accessibles d'une solution de FBPase C174S fraîche avec du DTNB, on obtient un complexe FBPase-TNB qui peut être analysé spectrophotométriquement en fonction du temps (Wang et al., 1996). La figure 31 présente les spectres obtenus sur 12 heures et

montre clairement la dissociation du complexe en FBPase et TNB^- qui présente un pic à 412 nm. Dans ces conditions d'expérimentations oxydantes (présence d' O_2), l'explication la plus plausible pour cette dissociation réside dans un réarrangement interne permettant la formation d'un pont disulfure qui libère le TNB fixé.

Spectres de la dissociation du complexe TNB-FBPase C174S

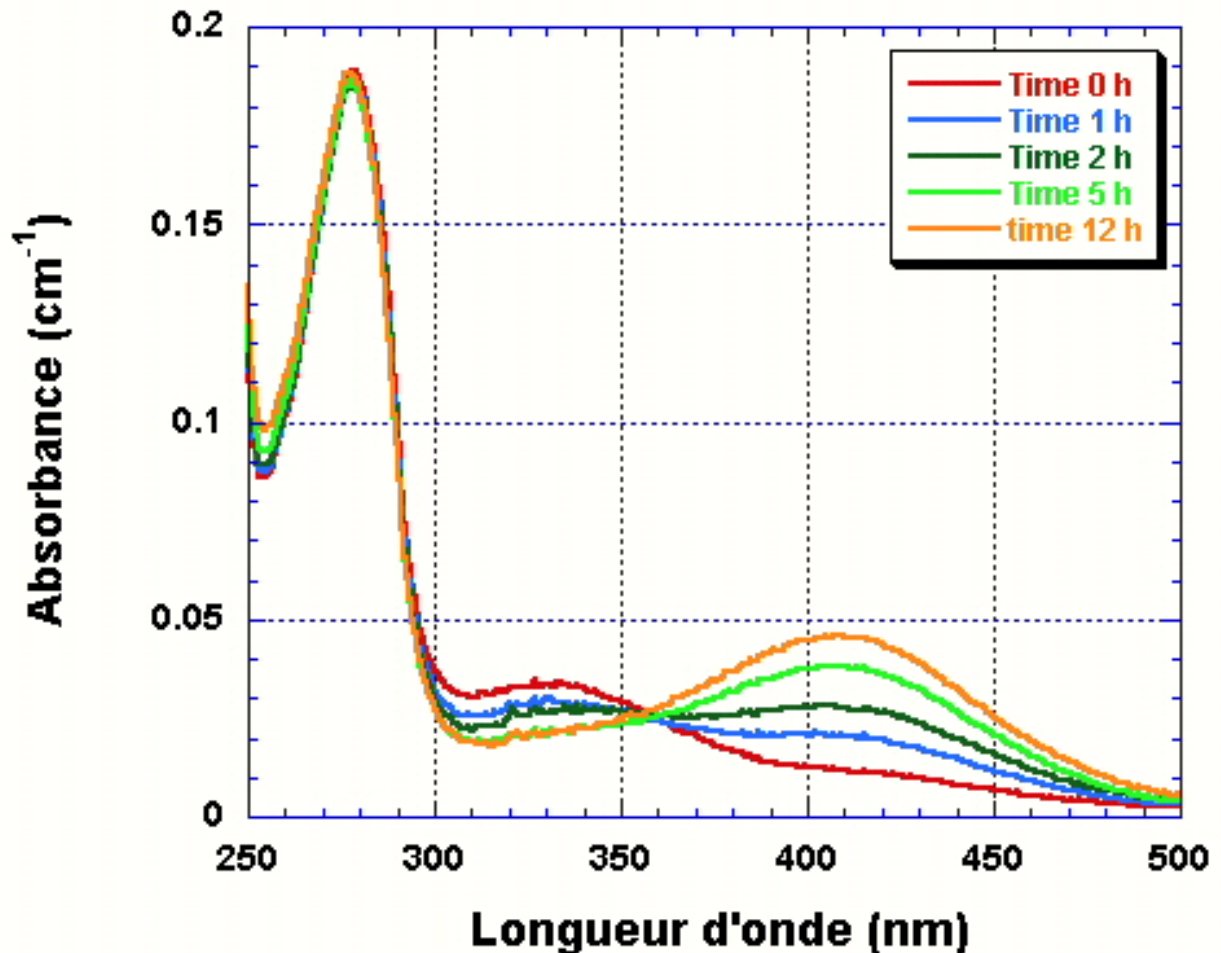


Figure 31. Spectres du complexe TNB-FBPase C174S montrant la libération du TNB^- (pic à 412 nm) en fonction du temps d'incubation à 25 °C. Le complexe présente un profil typique (en rouge) avec le pic à 280 nm dû à la protéine et un épaulement à 330 nm dû à la liaison du TNB à la protéine (Wang et al., 1996).

8 RESULTATS ET DISCUSSIONS

8.1 PARTIE V: FORMATION D'HETERODIMERES STABLES ENTRE LA FBPASE ET LA TRX F

La réduction de la FBPase par la Trx f implique la formation transitoire d'un hétérodisulfure entre la Cys46 de la Trx f et une des cystéines (Cys155 ou Cys174) de la FBPase. Dans le but de stabiliser le complexe Trx f-FBPase ainsi que de déterminer la cystéine de la FBPase formant ce pont disulfure, les différentes protéines WT et mutantes disponibles ont été mélangées et analysées sur gel SDS-PAGE en conditions non-réductrices.

8.1.1 Formation de l'hétérodimère sans addition d'oxydants

Des échantillons de FBPase WT et de mutants C155S, C174S, C179S, C155/174S, C155/179S et C174/179S ont été mélangés dans un rapport 1:4 avec des échantillons de Trx f WT, C49S ou C49/73S puis incubés dans un tampon à pH 7.0, saturé en air, pendant 30 minutes à 25 °C. La figure 32 présente les résultats de l'analyse des ces mélanges sur gel SDS-PAGE dans des conditions non-réductrices. Trois bandes principales sont présentes, la première correspond à la Trx f (12.5 kDa), la deuxième à la FBPase monomérique (44 kDa) et la dernière au complexe covalent formé entre la Trx f et un monomère de la FBPase (~60 kDa). La taille du complexe observée est légèrement supérieure à la somme arithmétique d'une Trx f et d'un monomère de FBPase, ce phénomène est vraisemblablement imputable à la structure non linéaire formée par l'hétérodimère en présence de SDS.

L'observation la plus frappante est le lien entre la présence d'hétérodimère et la présence de la Cys155. La mutation de la Cys155 entraîne une disparition pratiquement complète de l'hétérodimère, sauf pour le mélange Trx f C49S et FBPase C155S où une très faible bande à 60 kDa est distinguable. Cependant cette interaction n'a pas lieu entre la Trx f C49/73S et la FBPase C155S comme le confirme la révélation aux anticorps anti-FBPase (Fig. 33) des mêmes échantillons, ni avec les FBPases C155/174S et C155/179S, ce qui permet de supposer que cette faible bande est artefactuelle.

La Trx f WT en absence de réducteur a son site actif oxydé, ce qui empêche la formation d'un hétérodisulfide entre la Cys46 et une cystéine de la FBPase. L'absence de complexe avec la Trx f WT démontre en outre que la Cys73 qui est libre et exposée en surface ne peut pas former un pont disulfure avec la FBPase.

Les Trx f mutantes (C49S et C49/73S) forment par contre des complexes avec la FBPase WT. Cette interaction est grandement augmentée avec les mutations de la Cys174 et/ou Cys179 de la FBPase. Si la mutation de la Cys174, qui est impliquée dans le disulfide régulateur, est compatible avec l'augmentation de l'hétérodimère (les deux protéines conservent les cystéines qui forment le pont intermoléculaire), la FBPase C179S est supposée se comporter comme la FBPase WT. L'augmentation de la formation d'hétérodimère induite par la mutation de la Cys179 est certainement

due à la légère déstabilisation de la structure de l'insertion (Chapitre 7) qui rend le pont de régulation (et la Cys155) plus facilement accessible.

La sensibilité accrue procurée par les anticorps permet de mettre en évidence la présence d'une bande supplémentaire de poids moléculaire élevé (~200 kDa) qui est peut être un polymère de sous-unités de FBPase liées de manière covalente.

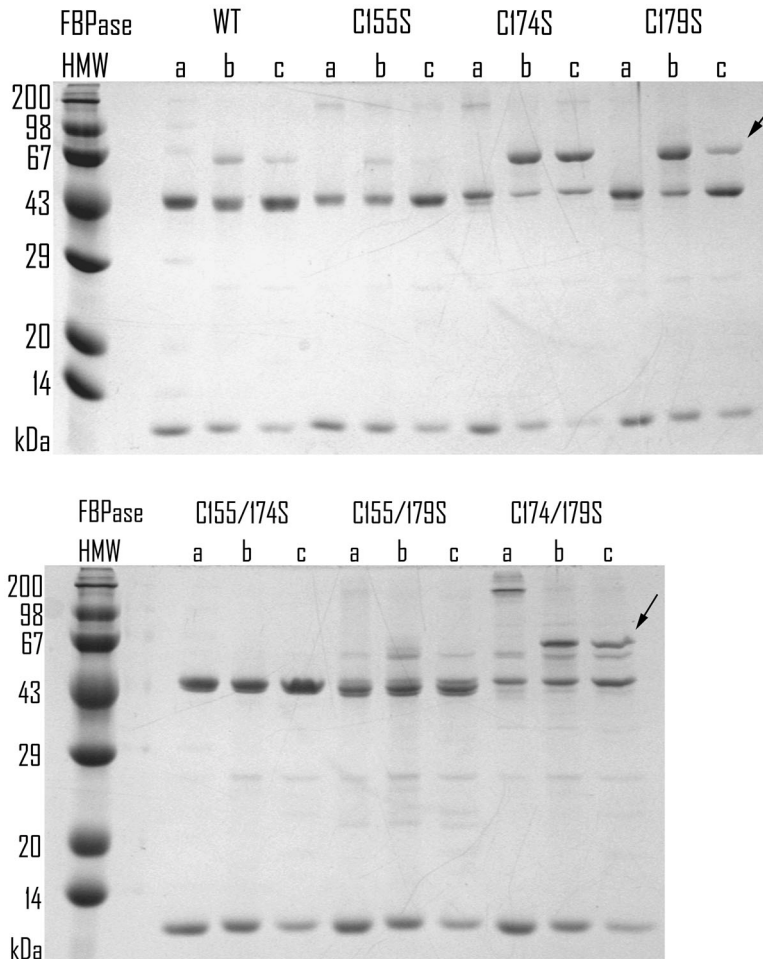


Figure 32. Analyse sur gel SDS-PAGE des mélanges contenant les Trx f et les FBPases. Les protéines sont mélangées dans un rapport 1:4 FBPase:Trx f dans du tampon 50 mM TEA-Cl pH 7.0 et incubées 30 minutes à 25°C sous conditions aérobiques. Des aliquots de ces mélanges sont ensuite séparés sur un gel 15% sans réducteurs, puis colorés au bleu de Coomassie. Les flèches indiquent l'hétérodimère FBPase-Trx f.

a: Trx f WT, b: Trx f C49S, c: Trx f C49/73S, HMW: standard de protéines précolorées (GibcoBRL).

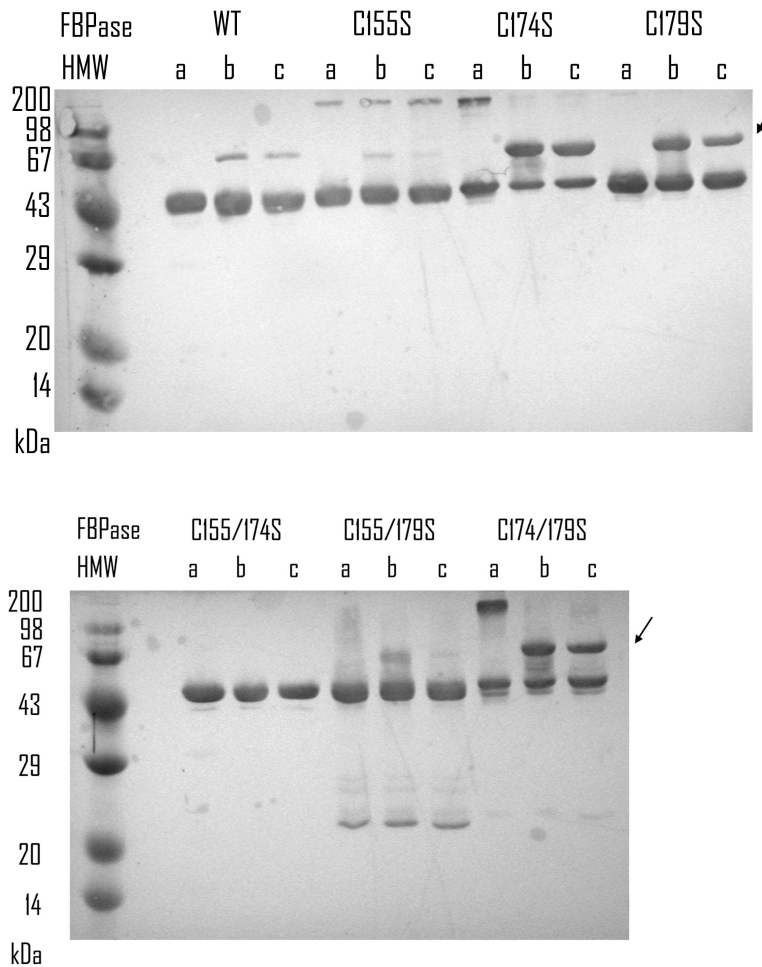


Figure 33. Analyse sur immunoblot des mélanges contenant les Trx f et les FBPases. Les échantillons sont les mêmes que pour la figure 31, mais après la séparation sur gel, les protéines sont transférées sur nitrocellulose, puis incubées avec des anticorps anti-FBPase et révélées avec la peroxydase. Les flèches indiquent l'hétérodimère FBPase-Trx f. a: Trx f WT, b: Trx f C49S, c: Trx f C49/73S, HMW: standard de protéines précolorées (GibcoBRL).

8.1.2 Formation d'hétérodimère en présence d'oxydants

8.1.2.1 Addition de diamide

L'addition de 10 mM final de diamide lors de l'incubation des mélanges de protéines produit essentiellement le même profil avec une augmentation considérable de la proportion d'hétérodimère (Fig. 34). Les quantités de complexes formés avec la FBPase WT équivalent ceux de la FBPase C179S, alors que la FBPase C174S se retrouve pratiquement complètement sous forme d'hétérodimère en présence des mutants de Trx f. Un autre effet de la diamide est l'augmentation sensible de la formation d'homodimère de Trx f (~25 kDa), et ceci pour les trois Trx f utilisées. La Trx f WT forme ce dimère grâce à sa troisième cystéine (Cys73)(del Val, 1996), alors que la Trx f C49/73S n'a plus que la Cys46 pour former un liaison disulfure et le mutant C49S conserve ses deux cystéines de surface.

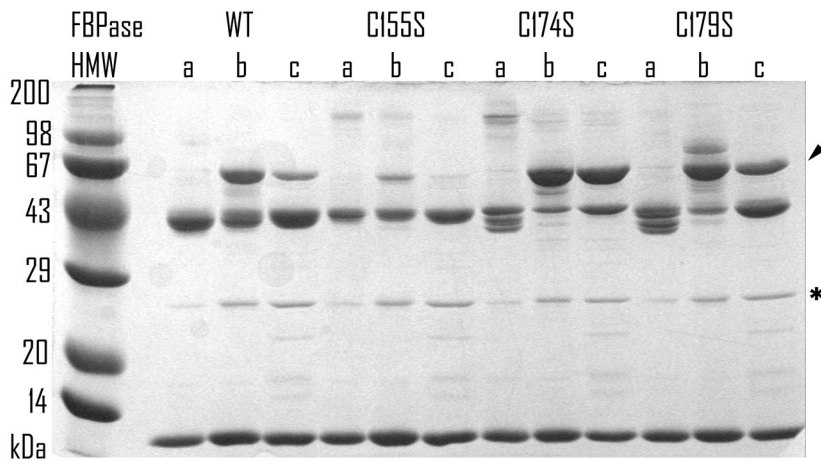


Figure 34. Analyse sur gel SDS-PAGE des mélanges contenant les Trx f et les FBPases. Les protéines sont mélangées dans un rapport 1:4 FBPase:Trx f dans du tampon 50 mM TEA-Cl pH 7.0 en présence de 10 mM diamide et incubées 30 minutes à 25°C sous conditions aérobiques. Des aliquots de ces mélanges sont ensuite séparés sur un gel 15% sans réducteurs, puis colorés au bleu de Coomassie. La flèche indique l'hétérodimère FBPase-Trx f, l'astérisque l'homodimère de Trx f. a: Trx f WT, b: Trx f C49S, c: Trx f C49/73S, HMW: standard de protéines précolorées (GibcoBRL).

8.1.2.2 Addition de Cu^{2+}

L'addition de 1.5 mM de CuSO_4 lors de l'incubation produit le même résultat que la diamide mais avec l'apparition de bandes supplémentaires de tailles intermédiaires (~50 kDa) entre le monomère de FBPase et l'hétérodimère et dont l'origine demeure énigmatique (Fig. 35). L'utilisation d'anticorps anti-Trx f pour révéler l'immunoblot présenté dans la figure 36 montre de nombreuses bandes dont l'origine est explicable par la très grande sensibilité de cet anticorps qui permet de mettre en évidence des bandes invisibles lors de la coloration au bleu de Coomassie. Il semble que les Trx f WT et Trx f C49S soient susceptibles d'interagir avec les nombreuses protéines contaminantes présentes sous forme de traces dans les préparations de protéines ou de former des multimères. Cependant ces bandes parasites sont absentes lors des incubations avec la Trx f C49/73S ce qui permet de supposer que ces interactions sont principalement le fait de la Cys73 de la Trx f. Cependant la bande inconnue de ~50 kDa n'est pas reconnue par l'anticorps anti-Trx f ce qui laisse supposer que cette bande est composée de FBPase.

La Trx f WT semble capable dans ces conditions (présence de Cu^{2+}) de former un hétérodimère avec les FBPases C174S et C179S, ceci peut impliquer la Cys73 ou pour la FBPase C174S, une attaque du pont disulfure de la Trx f par la Cys155 libre.

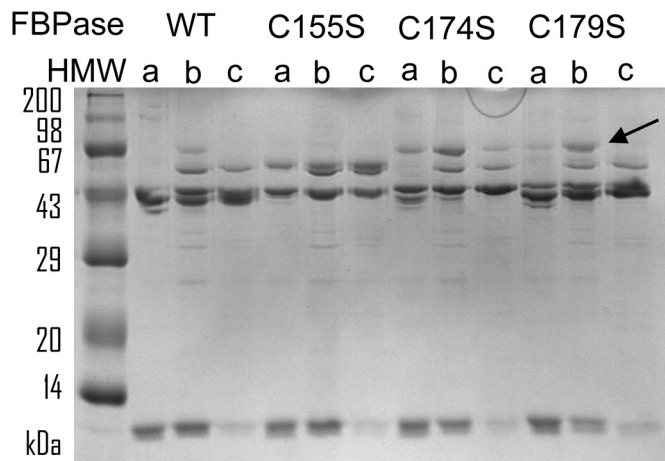


Figure 35. Analyse sur gel SDS-PAGE des mélanges contenant les Trx f et les FBPsases. Les échantillons sont préparés comme pour le gel avec la diamide, mais celle-ci est remplacée par 1.5 mM CuSO₄. La flèche indique l'hétérodimère FBPase-Trx f
a: Trx f WT, b: Trx f C49S, c: Trx f C49/73S, HMW: standard de protéines précolorées (GibcoBRL).

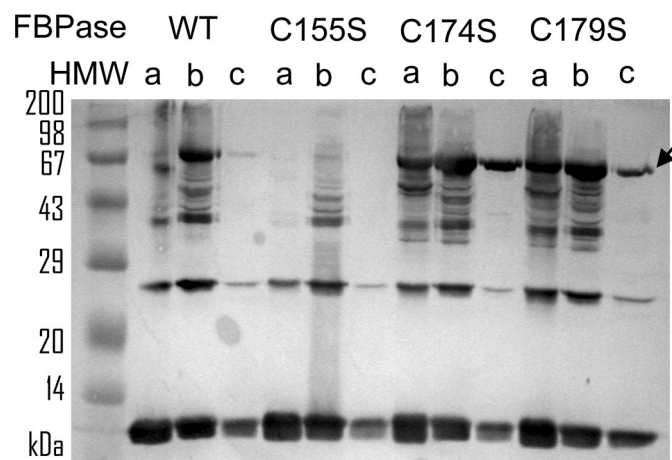


Figure 36. Analyse par immunoblot des mélanges contenant les Trx f et les FBPsases traités avec le CuSO₄. Révélation avec les anticorps anti-Trx f. La flèche indique l'hétérodimère FBPase-Trx f
a: Trx f WT, b: Trx f C49S, c: Trx f C49/73S, HMW: standard de protéines précolorées (GibcoBRL).

8.1.2.3 Comportement des FBPsases en présence de Cu²⁺

Le comportement de la FBPsases WT et des simples mutants en présence de 1.5 mM CuSO₄ est présenté sur la figure 37. La FBPase WT présente deux bandes distinctes l' une à ~70 kDa qui est peut être un dimère de FBPase et l'autre de taille légèrement inférieure à la FBPase réduite. Les mutants de FBPase en présence de cuivre présentent également plusieurs bandes de tailles proches des formes réduites (~43 kDa). Ce phénomène est vraisemblablement induit par le Cu²⁺ qui permet la formation de ponts disulfures internes entre des cystéines libres et suffisamment proches. Les boucles ainsi formées font légèrement varier la migration des monomères de FBPase. La bande formée par la FBPase WT à 70 kDa reste plus surprenante, car elle est trop petite pour clairement indiquer un homodimère de FBPase.

Il est cependant difficile de déterminer à quel moment la formation de ces liaisons intervient. Il n'est pas impossible que ces structures apparaissent lors de la dénaturation des protéines par le SDS qui se fait encore en présence de CuSO₄. La bande à ~50 kDa observée dans la figure 35 n'apparaît pas sur ce gel, il faut donc admettre que la présence de sulfate de cuivre provoque des interactions imprévisibles qui ne sont pas explicables avec les expériences présentées ci-dessus.

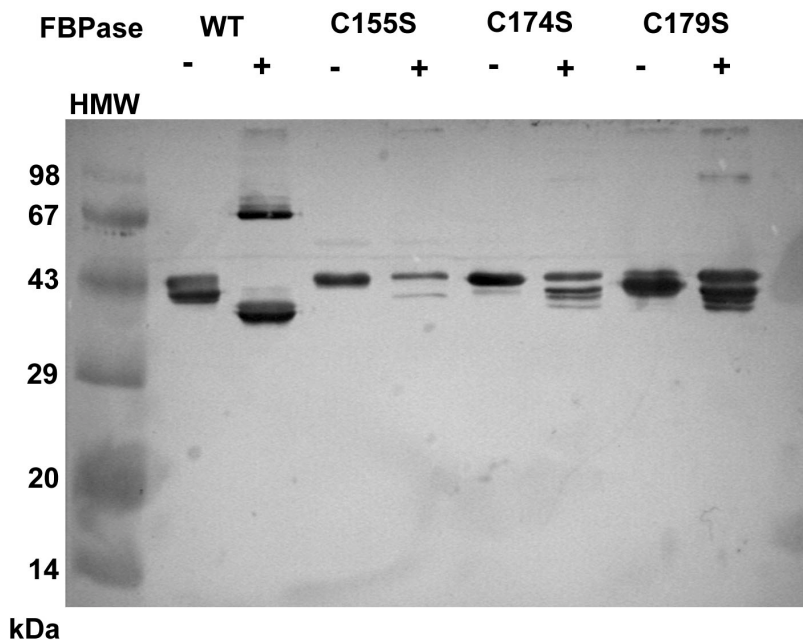


Figure 37. Immunoblot révélé aux anticorps dirigés contre la FBPase montrant le comportement des différentes FBPases en présence de CuSO_4 . Echantillons de protéines incubés en présence de 1.5 mM CuSO_4 (+) et absence de cuivre (-). La séparation sur gel SDS-PAGE est réalisée sans MET.

8.1.3 Réduction des complexes Trx f-FBPase

La réduction de la liaison covalente entre la Trx f et la FBPase permet de s'assurer que la formation de ce complexe implique effectivement des cystéines. Le dimère formé entre la FBPase C174S et la Trx f C49S est facilement séparable par réduction avec du DTT (Fig. 38) alors que des monothiois tel que le glutathion ou le 2-mercaptoéthanol permettent de conserver le complexe jusqu'à des concentrations relativement élevées de réducteurs (Fig. 39). De plus, une faible concentration de MET lors de la réaction d'hétérodimérisation n'empêche pas la formation de l'hétérodisulfide. En effet, les mutants de Trx f sont conservés en présence de réducteur (14 mM MET) qui se retrouve dilué dans le milieu d'incubation. Des essais de formation d'hétérodimère avec des Trx f C49S passées au préalable sur une colonne de désalage G-25 afin d'éliminer ces restes de MET n'ont pas permis d'augmenter la proportion de complexes Trx f C49S-FBPase C174S.

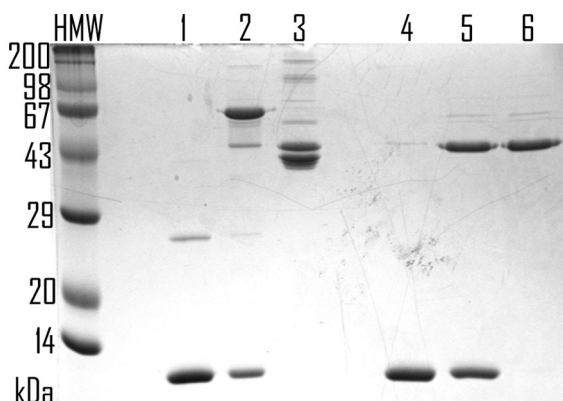


Figure 38. Analyse sur gel SDS-PAGE de la réduction de l'hétérodimère Trx f C49S-FBPase C174S avec du DTT. Les protéines sont incubées en présence de 10 mM de diamide (1-3), puis réduites avec 10 mM DTT (4-5). 1&4: Trx f C49S, 2&5: Trx f C49S et FBPase C174S, 3&6: FBPase C174S.

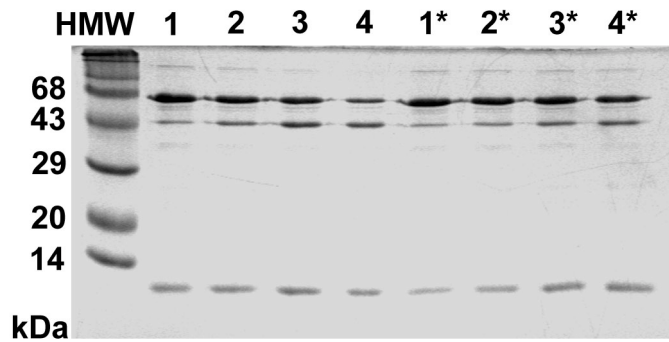


Figure 39. Effet de monothiols sur le complexe Trx f C49S-FBPase C174S. Le mélange de FBPase C174S et de Trx f C49S est incubé en présence de 0 mM (1), 2 mM (2), 4 mM (3) et 10 mM de MET ou de glutathion (*) avant d'être séparé sur gel SDS-PAGE.

8.1.4 Formation d'hétérodimères en fonction de la concentration de Trx f

La quantité maximale de Trx f qui peut se fixer sur un tétramère de FBPase est théoriquement de quatre. Dans la figure 40, la concentration de FBPase est fixée à 1.5 μ M final (6 μ M en sous-unité) alors que la concentration de Trx f augmente dans les échantillons. Jusqu'à une concentration de 4 μ M de Trx f, celle-ci est complètement liée par la FBPase, alors que des concentrations plus élevées laissent une partie des Trx f libres. Dans ces conditions d'expériences, il s'est avéré impossible de complètement saturer les FBPases avec des Trx f, même avec des rapports de 1:40 (FBPase:Trx f) et en présence de diamide.

La formation d'un complexe entre la Trx f et la phosphoribulokinase (PRK) est améliorée si l'enzyme-cible est modifiée avec du DTNB (Brandes et al., 1996) et permet d'obtenir la disparition de la PRK seule. Une expérience semblable où la FBPase C174S est modifiée en FBPase C174S-TNB, purifiée sur G-25 avant d'être incubée avec de la Trx f C49S également purifiée sur G-25 n'a pas permis de forcer l'équilibre vers l'hétérodimère. Une faible proportion de monomères de FBPases libres est toujours présente.

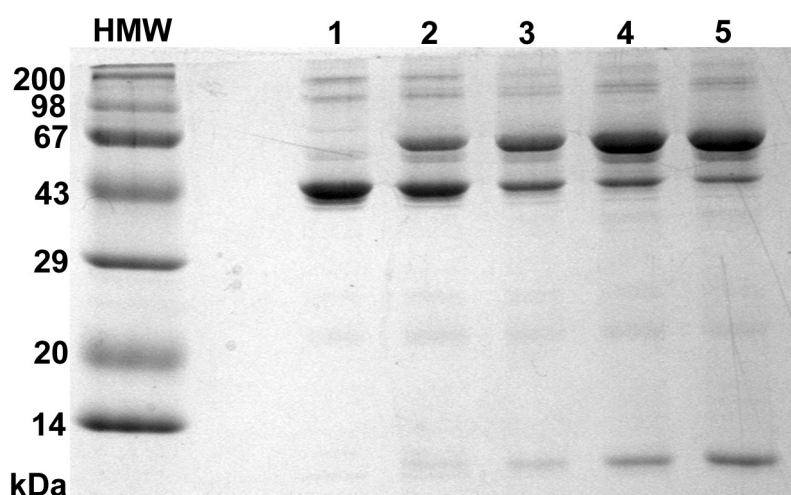


Figure 40. Formation de l'hétérodimère en fonction de la concentration de Trx f.

1.5 μ M de FBPase C174S est incubé avec 0 μ M (1), 2 μ M (2), 4 μ M (3), 6 μ M (4) et 8 μ M (5) de Trx f C49S passée sur une colonne de dessalage.

8.1.5 Séparation sur FPLC du complexe Trx f-FBPase

Afin d'isoler une forme homogène de complexes Trx f-FBPase, plusieurs séparations sur colonne ont été tentées. Différentes colonnes et conditions ont été testées, mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec une colonne échangeuse d'anions (monoQ) sans pour autant être extrêmement concluants. Les mélanges de protéines utilisées ont été principalement faits avec la FBPase C174S et la Trx f C49S et ce, tant pour des raisons qualitatives, ce sont les protéines avec lesquelles l'hétérodimère se forme le mieux, que pour des raisons pratiques, la production de ces deux protéines est relativement aisée.

La figure 41 est le profil d'élution d'un mélange de FBPase C174S et de Trx f C49S en excès (rapport 1:10) sur une colonne MonoQ dans un tampon à pH 7.0. Le premier pic (double) est la Trx f C49S libre qui est éluée lors du lavage à 0.1 M NaCl et le dernier pic est celui correspondant à la FBPase C174S seule (élution à ~0.4 M NaCl). Entre ces deux, quatre pics plus ou moins bien séparés sont visibles, il pourrait s'agir de FBPases saturées à différents degrés par la Trx f (1:4, 1:3, 1:2, 1:1). Des échantillons des fractions contenant ces différents pics ont été précipités au TCA, puis chargés sur gel SDS-PAGE sans réducteur (Figure 42). Les deux premiers échantillons correspondants au double pic du lavage confirme que la Trx f n'est effectivement pas retenue par la résine, par contre les échantillons suivants ne correspondent pas vraiment au modèle théorique évoqué ci-dessus. Si les échantillons 3 à 6 contiennent bel et bien des hétérodimères, de la Trx f monomérique est également présente ainsi qu'une multitude de bandes de poids moléculaires compris entre 40 et 60 kDa plus deux bandes de M_r plus élevés. D'autre part le dernier pic ne présente pas ou peu d'hétérodimère, mais plusieurs bandes de M_r aux alentours des 45 kDa, qui pourraient correspondre au profil de la FBPase C174S oxydée observé dans la figure 37.

Afin de s'assurer que cette multiplication de bandes n'est pas due à une formation de liaisons disulfures internes provoquée par la préparation des échantillons pour le gel, les mêmes échantillons (3 à 7) ont été concentrés de manière plus douce sur des microfiltres Microcon 10 avant d'être chargés sur le gel. Le résultat obtenu est nettement plus concluant (Fig. 43), même s'il ne confirme pas définitivement l'hypothèse de 4 classes de complexes Trx f-FBPase suivant le degré de saturation des FBPases par les Trx f. Les traces de Trx f libres observées peuvent être dues à l'attaque de l'hétérodisulfide par une cystéine de la FBPase (Cys179 par exemple) qui va former un pont disulfure avec la Cys155 et libérer la Trx f.

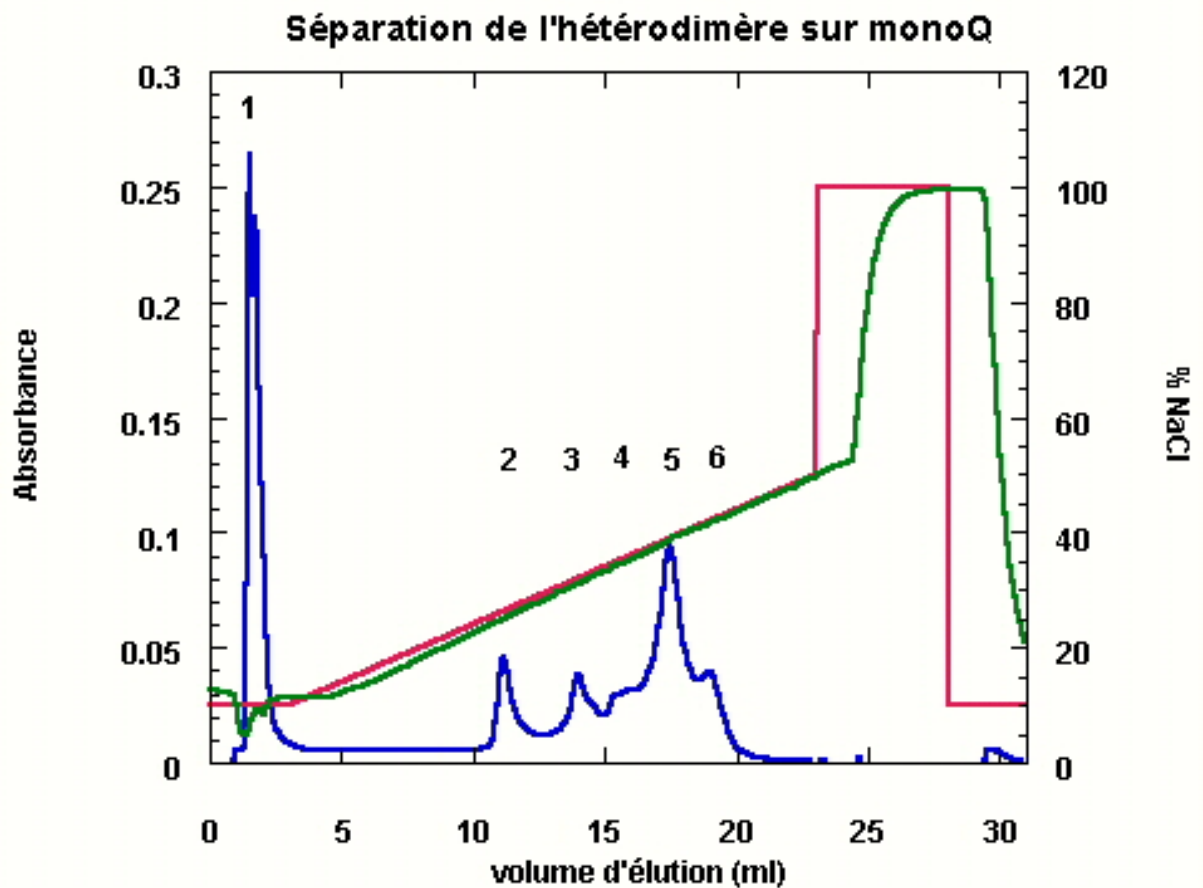


Figure 41. Profil d'élution d'un échantillon du mélange FBPase C174S:Trx f C49S (1:10) chargé sur une colonne échangeuse d'anions MonoQ. L'absorbance à 280 nm est en bleu, le gradient théorique (0.1 à 0.5 M NaCl) en rouge et le gradient réel est en vert. Les pics sont numérotés de 1 à 6.



Figure 42. Analyse sur gel SDS-PAGE sans réducteur des fractions précipitées au TCA de la séparation du mélange FBPase C174S-Trx f C49S sur la colonne MonoQ.

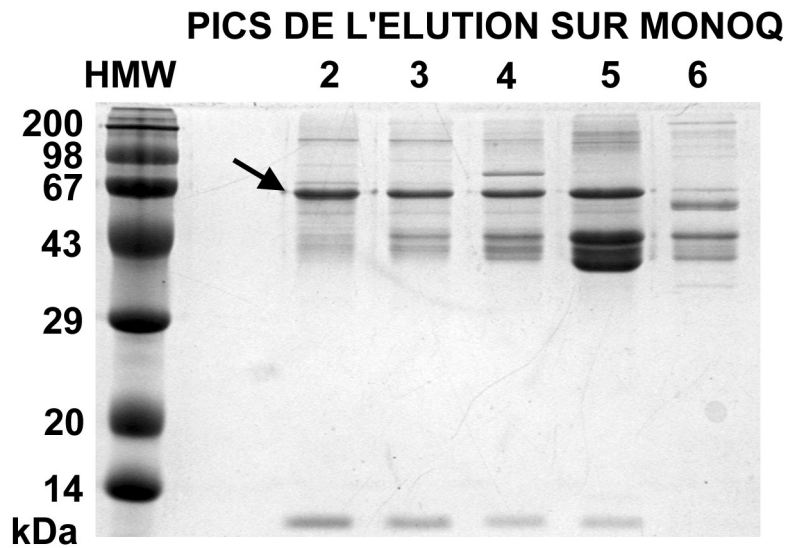


Figure 43. Analyse sur gel SDS-PAGE sans réducteur des fractions concentrées sur microcon 10 de la séparation du mélange FBPase C174S-Trx f C49S sur la colonne MonoQ. La flèche indique le complexe covalent FBPase C174S-Trx f C49S.

8.1.6 Formation de complexes entre la Trx f et des protéines chloroplastiques

La mutation de la Cys49 permet à la Trx f de former un hétérodimère stable avec la FBPase. Dans le but de voir dans quelle mesure ce système pourrait mettre en évidence les protéines cibles de la Trx f, des extraits de protéines stromatiques et de thylacoïdes ont été incubés avec des Trx f C49S, puis séparés sur gel SDS-PAGE, transférés sur nitrocellulose. La figure 44 présente un immunoblot révélé avec des anticorps anti-Trx f qui mettent en évidence un certain nombre de bandes. Si les deux bandes de M_r les plus petits correspondent à la Trx f monomérique et dimérique, les autres sont formées de complexes covalents Trx f C49S-protéine X. L'extrait de protéines stromatiques présente une dizaine de bandes supplémentaires, alors que les thylacoïdes ont quatre bandes plus ou moins masquées par un halo, peut-être provoqué par la présence des membranes des thylacoïdes dans l'échantillon.

De nombreuses enzymes chloroplastiques sont susceptibles d'interagir avec la Trx f. La figure 45 permet de montrer que l'hétérodimère Trx f C49S-FBPase native se forme effectivement avec l'extrait de protéines brut du stroma, mais il faudrait d'autres anticorps dirigés contre les autres enzymes cibles de la Trx f pour déterminer la nature des autres complexes observés dans la figure 44.

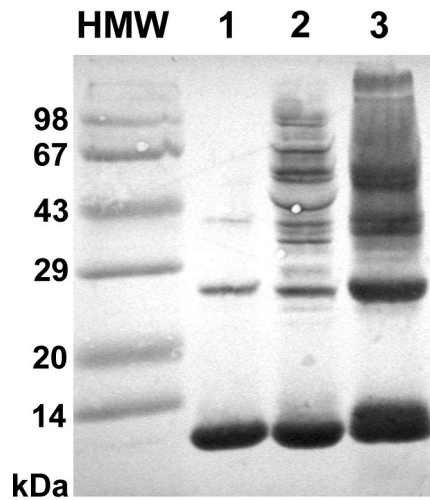


Figure 44. Immunoblot révélé avec des anticorps anti-Trx f. Trx f C49S (1), Trx f C49S en excès incubée avec un extrait de protéines du stroma (2) et des thylacoïdes (3).

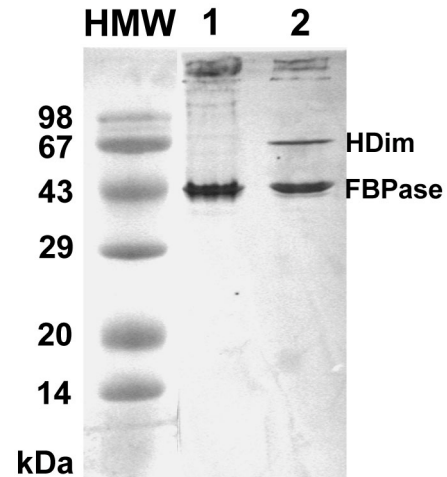


Figure 45. Immunoblot révélé avec des anticorps anti-FBPase. Extrait de protéines stromatiques (1) et mélange de Trx f C49S en excès et de protéines du stroma des chloroplastes (2).

Des expériences d'immunoprécipitation ainsi que la confection d'une colonne d'affinité Trx f C49S-CH-sépharose ont été tentées afin de pouvoir isoler les protéines du stroma qui interagissent avec la Trx f des autres. Malheureusement les résultats ne sont pas vraiment concluants comme le gel SDS-PAGE des fractions d'une séparation d'un échantillon stromatique sur la colonne d'affinité le montre (Fig. 46). Après un lavage à 1 M NaCl, l'ajout de DTT libère effectivement des protéines, mais le profil ressemble beaucoup à celui des premières fractions, comme si la Trx f C49S avait la capacité de se lier avec les protéines sans véritable spécificité. La forte présence de la Rubisco (hexadécamère de 8 petite sous-unités (14 kDa) et 8 grandes (56 kDa)) est suspecte car cette enzyme très étudiée n'est pas connue pour être directement activée par la Trx f. Néanmoins des tests d'activité ont permis de mettre en évidence qu'une partie des FBPases se fixent sur la Trx f C49S et sont éluées par ajout de réducteurs ce qui laisse supposer que ce système de séparation pourrait être utilisable en optimisant les conditions.

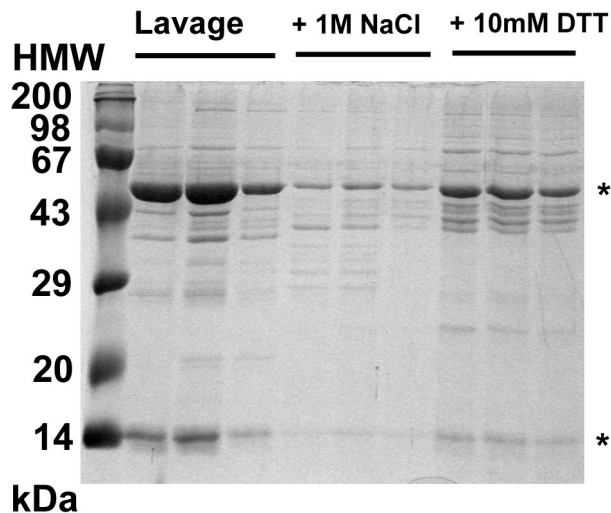


Figure 46. Analyse sur gel SDS-PAGE de fractions obtenues lors de la séparation de protéines stromatiques sur la colonne d'affinité Trx f C49S-CH-Sépharose. La colonne est équilibrée dans du tampon 50 mM TEA-Cl pH 7.0 + 50 mM NaCl, puis lavée avec le même tampon, ensuite la concentration de NaCl est élevée à 1 M et enfin les protéines sont détachées de la colonne par adjonction de 10 mM DTT. Les astérisques marquent l'emplacement des deux sous-unités de la Rubisco.

8.1.7 Discussion

La cystéine de la Trx f impliquée dans la formation d'un hétérodisulfide transitoire permettant la réduction des enzymes cibles est connue (Cys46) (Brandes et al., 1993), alors que la cystéine de la FBPase interagissant avec la Cys46 est restée hypothétique. Si la comparaison des séquences en acides aminés des FBPases cytosoliques et chloroplastiques a rapidement permis de situer l'insertion d'une quinzaine d'acides aminés (compris entre les acides aminés 150 à 180 environ) permettant la régulation de la forme chloroplastique par la Trx f, les premières études par mutagenèse (Jacquot et al., 1995; Jacquot et al., 1997) n'ont pas permis d'assigner un rôle aux trois cystéines strictement conservées de cette zone, ni de

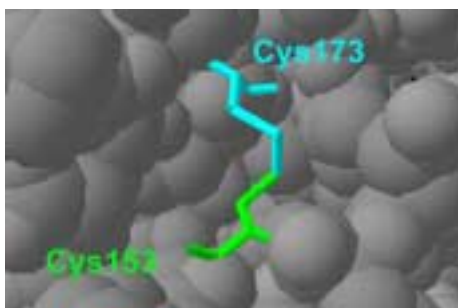


Figure 47. Vue de la surface de la zone de régulation de la FBPase de pois montrant le pont disulfure. La Cys173 (174 pour l'épinard) semble être plus exposée au solvant.

déterminer quelles cystéines étaient impliquées dans le pont disulfure permettant la régulation, bien que les premières hypothèses l'imaginaient entre la Cys174 et Cys179. Seule la résolution de la structure de la FBPase chloroplastique de pois (Chiadmi et al., 1999) en 1999 a montré le pont entre la Cys153 et Cys173 (155 et 174 pour l'épinard). L'analyse de cette structure ou d'un modèle de la FBPase d'épinard dérivé de celle de pois, au niveau de l'accessibilité des deux cystéines du pont disulfure, semble démontrer que la Cys174 est en surface et donc la cystéine la plus évidente pour former un pont avec la Cys46 de la Trx f (Fig. 47).

Ce modèle est infirmé par les résultats présentés ci-dessus, où la formation d'un hétérodimère Trx f-FBPase est strictement lié à la présence de la Cys155 (Fig. 48) alors que l'absence de la Cys174 augmente la formation de complexe.

L'explication la plus facile de cette contradiction est de mettre cette différence sur le compte d'une variation interspécifique entre la FBPase de pois et celle d'épinard dont la structure de l'insertion n'est pas résolue (Villeret et al., 1995b). Il est possible d'imaginer que la boucle contenant le pont de régulation pour la protéine d'épinard aie une conformation différente qui rend la Cys155 plus accessible. Cette hypothèse est difficilement défendable, compte tenu de l'homologie élevée de la FBPase d'épinard et de pois, mais reste possible. Une explication plus vraisemblable est que lors de l'arrimage (docking) de la Trx f sur la FBPase l'orientation des deux protéines favorise l'attaque nucléophile de la Cys46 sur la Cys155. Le processus de docking peut également provoquer un léger changement dans la structure de la boucle de la FBPase et permettre la formation de l'hétérodisulfide entre la Cys46 et Cys155. La modélisation de l'interaction entre ces deux protéines en tenant compte de l'environnement en acides aminés du site actif de la Trx f, comprenant une zone hydrophobe entourée de résidus principalement positifs, et du site de régulation de la FBPase à forte composantes négatives fournirait certainement quelques indices.

	Trx f WT	C49S	C49/73S
FBPase WT	-	++	+
C155S	-	±	-
C174S	-	+++	+++
C179S	-	+++	++
C155/174S	-	-	-
C155/179S	-	-	-
C174/179S	-	+++	++

Figure 48. Tableau résumant la capacité des différentes combinaisons testées à former un complexe covalent.

La formation de l'hétérodimère est très rapide, il est visible après quelques minutes d'incubation déjà et ne nécessite pas d'oxydant additionnel (cuivre ou diamide) alors que dans des travaux similaires sur la phosphoribulokinase (Brandes et al., 1996) les auteurs doivent incuber les mélanges pendant plusieurs heures en présence de cuivre pour que l'hétérodimère se forme. L'interaction Trx f-FBPase est suffisamment spécifique pour former un pont entre les cystéines 46 et 155 même en présence de réducteur comme le MET, mais est néanmoins réversible par réduction avec le DTT. L'addition de diamide renforce le phénomène d'hétérodimérisation sans pour autant permettre la réaction complète de la FBPase avec la Trx f en excès, alors que le cuivre catalyse la formation de multiples bandes de Mr variables qui semblent principalement artefactuelles.

Un des buts finaux de ce travail était d'obtenir un hétérodimère stable et homogène formé d'un tétramère de FBPase lié de manière covalente avec 4 Trx f afin de résoudre la structure tridimensionnelle du complexe. Les séparations obtenues ne permettent pas d'affirmer qu'il est possible d'isoler un tel complexe, même si des indices le laissent supposer. Le choix de la FBPase C174S comme protéine-test n'est pas des plus heureux à la lumière des résultats obtenus lors de la caractérisation de ce mutant (Chapitre 7), où il semble probable qu'un pont disulfure artefactuel puisse se former entre la Cys155 et 179 (Fig. 49). La formation de ce lien cliverait l'hétérodisulfide Cys155-Cys46 (de la Trx f). Il serait intéressant de tester le

complexe avec la FBPase C174/179S, même si ce mutant a le désavantage d'être plus instable.

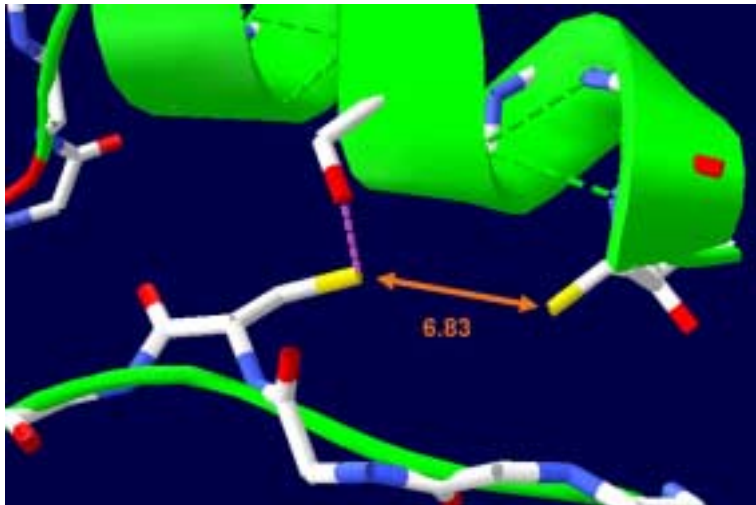


Figure 49. Modèle de la FBPase C174S. Vue agrandie de l'insertion de régulation. Le pont entre la Cys155 et la Ser174 n'est plus possible (violet), mais la distance entre les Cys155 et 179 n'est que de 6.83 Å (orange).

D'autre part l'analyse des différents pics de l'élution sur gel SDS est une méthode relativement brutale. La dénaturation par la chaleur en présence de détergents provoque peut-être le réarrangement cité ci-dessus qui libère une partie des Trx f C49S. Si l'analyse du mélange FBPase-Trx f n'est pas directement possible par tamisage moléculaire à cause des différences de taille dues à la liaison des Trx f (12.5 kDa) sur la FBPase (~160 kDa) trop minimes, il serait plus informatif de charger chaque pic obtenu lors de la séparation sur la monoQ sur une colonne de tamisage et d'observer le décalage dans les volumes d'élution mesurés.

L'affinité de la Trx f C49S pour ses protéines-cibles ainsi que sa capacité de former un hétérodisulfide stable pourrait être utilisée pour déterminer quelles enzymes chloroplastiques sont régulées par la Trx f. Si la colonne d'affinité Trx f C49S n'a pas donné des résultats probants, il est possible d'améliorer ce système en variant les conditions de pH et de concentration de sels. Ensuite les protéines interagissant avec la Trx f pourrait être déterminées par séparation sur gel à 2 dimensions et comparées avec une base de données telle que SWISS-2DPAGE.

9 CONCLUSION

Ce travail de thèse est articulé autour de deux axes principaux, la caractérisation des mutations réalisées sur la FBPase par mutagenèse dirigée d'une part, et la formation d'un complexe covalent entre la Trx f et la FBPase dans le but d'en résoudre la structure de l'autre.

La première partie est constituée d'une étude des effets de la mutation des Cys155, 174 ou 179 sur l'activité et l'activation de la FBPase chloroplastique. Une importante constatation est que les trois cystéines de la boucle permettant la régulation redox de la FBPase sont nécessaires pour conserver une FBPase viable *in vivo*. La mutation de la Cys155 ou 174 rompt le disulfide et rend l'enzyme constitutivement active et la mutation de la Cys179 provoque une déstabilisation structurale qui rend la FBPase trop facilement activable. Ces mutants ne possèdent plus l'interrupteur marche/arrêt qui permet de faire fonctionner la FBPase uniquement quand l'activité photosynthétique est suffisamment élevée pour rendre l'assimilation de CO₂ énergétiquement viable. Cette insertion de quelques acides aminés, qui est relativement récente du point de vue évolutif (Scheibe et al., 2000), est un "bricolage" adaptatif génial, mais qui reste extrêmement sensible.

D'autre part ces expériences démontrent les limites de la méthode de mutagenèse dirigée pour déterminer la fonction d'un acide aminé donné. La mutation de la Cys179 en sérine provoque vraisemblablement un changement structural minime au niveau du site de régulation, mais l'effet en est ressenti dans le site catalytique éloigné de 20 Å. Il est possible que ce phénomène soit dû au choix de la sérine, dont la chaîne latérale est hydrophile, comme acide aminé de remplacement. Le choix d'un acide aminé hydrophobe tel que l'alanine aurait peut-être eu un impact moindre. De même la formation d'une liaison artéfactuelle entre la Cys155 et 179 en absence de la Cys174 recrée un semblant de régulation redox. Ce phénomène est certainement rendu possible par la grande flexibilité de la boucle formant cette région, mais peut entraîner des interprétations erronées des résultats.

Les expériences visant à stabiliser l'hétérodisulfure transitoire qui se forme entre la Trx f et la FBPase durant la réaction d'interconversion thiols-disulfide ont également fourni leurs lots de résultats intéressants.

Après l'analyse de la structure de la FBPase chloroplastique de pois (Chiadmi et al., 1999), ainsi que d'un modèle de la FBPase d'épinard élaboré avec les programmes SPDV-viewer et Swiss-Model, il semblait acquis que c'était la Cys174 qui formait la liaison transitoire avec la Cys46 de la Trx f. Cependant les résultats obtenus contredisent cette assertion, il faut croire que lors de l'interaction des deux protéines, la Cys155 est préférentiellement attaquée par la Cys46. Ce phénomène laisse le champ ouvert à d'intéressantes investigations pour comprendre ce mécanisme.

La formation de ces hétérodimères covalents est très rapide et spontanée, l'addition d'agents oxydants augmentant relativement peu les proportions de complexes, alors que dans le cas de la formation d'hétérodimère entre la Trx f et la phosphoribulokinase le complexe n'apparaît qu'après 3 h et en présence de cuivre (Brandes et al., 1996). La facilité avec laquelle les hétérodimères Trx f-FBPase se

forment indique une affinité élevée de la Trx f pour le site de régulation de la FBPase. La distribution des charges sur les surfaces des deux protéines formant le contact doit être très complémentaire. Il serait intéressant de modéliser l'interaction de ces deux protéines en fixant comme paramètre que la Cys46 de la Trx f doit être suffisamment proche de la Cys155 de la FBPase pour former une liaison disulfure, puis de faire pivoter la Trx f autour de cet axe virtuel en tenant compte de la distribution des charges sur la surface de contact.

Le but final consistant à isoler un hétérodimère Trx f-FBPase homogène et de tenter d'en obtenir des cristaux n'a pas été atteint, mais les résultats obtenus lors des essais de séparations de mélanges FBPase C174S-Trx f C49S laissent supposer qu'avec un peu de persévérance il sera possible d'obtenir un complexe utilisable. De plus si la quantité d'hétérodimères purifiés n'est pas suffisante pour la cristallographie ou que l'obtention de cristaux n'est pas possible, il sera toujours possible de se tourner vers la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire qui permet de travailler avec les protéines en solution et dont les progrès permettent d'établir des structures de macromolécules de plus en plus grandes.

La résolution de la structure de l'hétérodimère de Trx f-FBPase apportera des informations appréciables pour appréhender la réaction de réduction/activation de la FBPase par la Trx f, ainsi que sur la sélectivité de cette interaction.

L'étude de l'interaction de la thiorédoxine f et de ses enzymes-cibles via la stabilisation de l'hétérodisulfure transitoire permet d'obtenir de nombreux résultats intéressants. L'utilisation des mutants de la thiorédoxine f pour former des complexes covalents pourrait être étendue à d'autres protéines telles que la NADP-malate déshydrogénase, la rubisco activase et même la ferrédoxine-thiorédoxine réductase. Il est fort possible que les hétérodimères ainsi obtenus soient plus facilement purifiables et cristallisables que dans le cas de la FBPase.

Un autre domaine d'intérêt basé sur la capacité des Trx f mutantes à former des hétérodimères et qui n'a été qu'effleuré durant ce travail est la détermination des protéines-cibles de la Trx f dans le chloroplaste. En effet la FBPase WT est susceptible de former un hétérodimère avec la Trx f C49S, et ceci même si la FBPase provient d'un extrait de protéines totales de stroma. Rien ne laisse supposer qu'il n'en va pas de même pour les autres cibles de la Trx f. Poursuivre dans la voie des colonnes d'affinité Trx f C49S ou C49/73S présente l'avantage de permettre des lavages intensifs, puis d'éluer les protéines d'intérêt par réduction de l'hétérodisulfide. Plusieurs adaptations de ce procédé sont imaginables, comme une réaction préliminaire des cystéines de surface de la Trx f avec du DTNB ce qui limiterait peut-être les interactions non-spécifiques.

Enfin, il serait judicieux de s'intéresser de plus près à la fonction des troisièmes cystéines strictement conservées qui se trouvent proche du site de régulation de la FBPase (Cys179), mais également proche du pont disulfure de la Trx f (Cys73) ou encore de la FTR (Cys27). Sont-elles impliquées dans le mécanisme d'interconversion redox ou n'ont-elles qu'un rôle structural?

Les nombreux résultats obtenus contribuent, à leur échelle, à l'élaboration d'un modèle visant à une meilleure compréhension des mécanismes complexes régulant la photosynthèse auquel ont travaillé, travaillent et travailleront de nombreux chercheurs. Cependant l'interprétation de ces résultats reste sujette à caution et je ne peux pas exclure une part de parti-pris. J'ai établi certaines hypothèses d'après les indices fournis par les expériences réalisées durant ce travail et des informations récoltées dans la littérature, mais il est parfois nécessaire de faire des choix parmi la masse de données disponibles sur ce sujet.

10 REFERENCES

- Aguilar, F., B. Brunner, L. Gardet-Salvi, E. Stutz & P. Schürmann (1992). Biosynthesis of active spinach-chloroplast thioredoxin *f* in transformed *E. coli*. 301-306.
- Allen, J.F. & N.G. Holmes (1993). Electron Transport and Redox Titration. In *Photosynthesis: Energy transduction A practical approach*. Anonymous. 103-141.
- Ballicora, M.A. & R.A. Wolosiuk (1990). Effect of alkaline pH on the activity and the structure of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. 35-41.
- Baretino, D., M. Feigenbutz, R. Valcàrel & H.G. Stunnenberg (1994). Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. 541-542.
- Brandes, H.K., F.W. Larimer, M.K. Geck, C.D. Stringer, P. Schürmann & F.C. Hartman (1993). Direct Identification of the Primary Nucleophile of Thioredoxin *f*. 18411-18414.
- Brandes, H.K., F.W. Larimer & F.C. Hartman (1996). The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin *f*. 3333-3335.
- Breazeale, V.D., B.B. Buchanan & R.A. Wolosiuk (1978). Chloroplast sedoheptulose 1,7-bisphosphatase: evidence for regulation by the ferredoxin/thioredoxin system. 521-528.
- Buc, J., J. Pradel, J.-C. Meunier, J.-M. Soulié & J. Ricard (1980). The pH-induced dissociation of fructose 1,6-bisphosphatase of spinach chloroplasts. 285-288.
- Buchanan, B.B. (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. 341-374.
- Buchanan, B.B., P. Schürmann & J.-P. Jacquot (1994). Thioredoxin and metabolic regulation. 285-293.
- Capitani, G., Z. Markovic-Housley, G. del Val, M. Morris, J.N. Jansonius & P. Schürmann (2000). Crystal Structures of Two Functionally Different Thioredoxins in Spinach Chloroplasts. 135-154.
- Chiadmi, M., A. Navaza, M. Miginiac-Maslow, J.-P. Jacquot & J. Cherfils (1999). Redox signalling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase. 6809-6815.
- Choe, J.Y., H.J. Fromm & R.B. Honzatko (2000). Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes. 8565-8574.

- Dai, S., C. Schwendtmayer, P. Schürmann, S. Ramaswamy & H. Eklund (2000). Redox Signaling in Chloroplasts: Cleavage of Disulfides by an Iron-Sulfur Cluster. 655-658.
- del Val, G. (1996). Etude de la structure et des fonctions des thiorédoxines chloroplastiques d'épinard par des approches moléculaires. 1-110 Université de Neuchâtel,
- del Val, G., F. Maurer, Ch. Bonny, A. Spielmann, E. Stutz & P. Schürmann (1993). Modification of the reactivity of thioredoxin *f* by site-directed mutagenesis. A37
- Gardemann, A., D. Schimkat & H. W. Heldt (1986). Control of CO₂ fixation. Regulation of stromal fructose-1,6-bisphosphatase in spinach by pH and Mg²⁺ concentration. 536-545.
- Geck, M. K. & F. C. Hartman (2000). Kinetic and mutational analyses of the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxins. 18034-18039.
- Geck, M. K., F. W. Larimer & F. C. Hartman (1996). Identification of residues of spinach thioredoxin *f* that influence interactions with target enzymes. 24736-24740.
- Goyer, A., P. Decottignies, S. Lemaire, E. Ruelland, E. Issakidis-Bourguet, J.-P. Jacquot & M. Miginiac-Maslow (1999). The internal Cys207 of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase can form mixed disulfides with thioredoxin. 165-169.
- Habeeb, A. F. S. A. (1972). Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In *Enzyme Structure, Part B*. C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff (eds.), p. 457-464, Academic Press, New York, London.
- Hanahan, D. (1987). Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning, A Practical Approach*. D. M. Glover (ed.), p. 109-135. IRL Press, Oxford.
- Hemsley, A., N. Arnheim, M. D. Toney, G. Cortopassi & D. J. Galas (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. 6545-6551.
- Hirasawa, M., P. Schürmann, J.-P. Jacquot, W. Manieri, P. Jacquot, E. Keryer, F. C. Hartman & D. B. Knaff (1999). Oxidation-Reduction Properties of Chloroplast Thioredoxins, Ferredoxin:Thioredoxin Reductase and Thioredoxin *f*-Regulated Enzymes. 5200-5205.
- Hirel, P. H., J.-M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat & S. Blanquet (1989). Extent of N-terminal excision from *Escherichia coli* cells is governed by the side chain length of the penultimate amino acid. 8247-8251.
- Hodges, M., M. Miginiac-Maslow, P. Decottignies, J.-P. Jacquot, M. Stein, L. Lepiniec, C. Crétin & P. Gadal (1994). Purification and characterization of pea thioredoxin *f* expressed in *Escherichia coli*. 225-234.
- Jacquot, J.-P., J. López-Jaramillo, A. Chueca, J. Cherfils, S. Lemaire, B. Chedozeau, M. Miginiac-Maslow, P. Decottignies, R. A. Wolosiuk & J. L. Gorgé (1995). High-

- level expression of recombinant pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. 675-681.
- Jacquot, J.-P., J. López-Jaramillo, M. Miginiac-Maslow, S. Lemaire, J. Cherfils, A. Chueca & J. Lopez-Gorge (1997). Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. 143-147.
- Ke, H., C.M. Thorpe, B.A. Seaton, F. Marcus & W.N. Lipscomb (1989). Molecular structure of fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8-Å resolution. 1475-1479.
- Knaff, D.B. (1996). Ferredoxin and Ferredoxin-Dependent Enzymes. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. C.F. Yocum and D.R. Ort (eds.), p. 333-361, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Knaff, D.B. (2000). Oxidation-reduction properties of thioredoxins and thioredoxin-regulated enzymes. 309-313.
- Kosower, N.S., E.M. Kosower & B. Wertheim (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to disulfide. 593-596.
- Laemmli, U.K. & M. Favre (1973). Maturation of the head of bacteriophage T 4. 575-599.
- Lakey, J. & F. Pattus (1989). A surprising omission. 14
- Laurent, T.C., E.C. Moore & P. Reichard (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. 3436-3444.
- Lozano, R.M., J.H. Wong, B.C. Yee, A. Peters, K. Kobrehel & B.B. Buchanan (1996). New evidence for a role for thioredoxin *h* in germination and seedling development. 100-106.
- Lunn, C.A. & V.P. Pigiet (1982). Localization of Thioredoxin from *Escherichia coli* in an Osmotically Sensitive Compartment. 11424-11430.
- Marcus, F. & P.B. Harrsch (1990). Amino acid sequence of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. 151-157.
- Marcus, F., L. Moberly & S.P. Latshaw (1988). Comparative amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphatases: Identification of a region unique to the light-regulated chloroplast enzyme. 5379-5383.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin--A fold for all reasons. 245-250.
- Martin, W., A.Z. Mustafa, K. Henze & C. Schnarrenberger (1996). Higher-plant chloroplast and cytosolic fructose-1,6- bisphosphatase isoenzymes: Origins via duplication rather than prokaryote-eukaryote divergence. 485-491.
- Nossal, N.G. & L.A. Heppel (1966). The Release of Enzymes by Osmotic Shock from *Escherichia coli* in Exponential Phase. 3055-3062.

- Porter, M.A., S. Milanez, C.D. Stringer & F.C. Hartman (1986). Purification and characterization of ribulose-5-phosphate kinase from spinach. 14-23.
- Portis, A.R. & H.W. Heldt (1976). Light-dependent changes of the Mg²⁺ concentration in the stroma in relation to the Mg²⁺ dependency of CO₂ fixation in intact chloroplasts. 434-436.
- Reichert, A., E. Baalman, S. Vetter, J.E. Backhausen & R. Scheibe (2000). Activation properties of the redox-modulated chloroplast enzymes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and fructose-1,6-bisphosphatase. 330-341.
- Ruelland, E. & M. Miginiac-Maslow (1999). Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition ? 136-141.
- Sambrook, J., T. Maniatis & E.F. Fritsch (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scheibe, R., A. Reichert, A. Dennes & O. Ocheretina (2000). Evolution of redox modulation in NADP-dependent malate dehydrogenase and in plastidial fructose-1,6-bisphosphatase. 12
- Schürmann, P. & B.B. Buchanan (2001). The structure and function of the ferredoxin/thioredoxin system in photosynthesis. In *Regulatory Aspects of Photosynthesis*. B. Andersson and E.M. Aro (eds.), p. in press, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Schürmann, P. & J.-P. Jacquot (2000). Plant thioredoxin systems revisited. p. 371-400, Annu. Reviews, Inc., Palo Alto, USA.
- Schürmann, P., K. Maeda & A. Tsugita (1981). Isomers in thioredoxins of spinach chloroplasts. 37-45.
- Schürmann, P. & R.A. Wolosiuk (1978). Studies on the regulatory properties of chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. 130-138.
- Schwarz, O., P. Schürmann & H. Strotmann (1997). Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H⁺-ATPase. 16924-16927.
- Villeret, V., S. Huang, Y. Zhang & W.N. Lipscomb (1995a). Structural aspects of the allosteric inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by AMP: The binding of both the substrate analogue 2,5-anhydro-D-glucitol 1,6-bisphosphate and catalytic metal ions monitored by X-ray crystallography. 4307-4315.
- Villeret, V., S. Huang, Y. Zhang, Y. Xue & W.N. Lipscomb (1995b). Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å resolution. 4299-4306.
- Wang, P.F., D.M. Veine, S.H. Ahn & C.H. Williams, Jr. (1996). A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: Preparation and characterization. 4812-4819.

Yang, J.T., C.-S.C. Wu & H.M. Martinez (1993). Calculation of Protein Conformation from Circular Dichroism. 208-271.

Zhang, N. & A.R. Portis Jr (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: A unique role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. 9438-9443.

Zimmermann, G., G.J. Kelly & E. Latzko (1976). Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. 361-367.

11 Annexe 1: Expression et purification de la Trx f C49S #4

- Les bactéries compétentes BL21 DE3 pLysS sont transformées avec le plasmide pET 3d Trx f C49S, puis incubées 20 heures à 22°C sur une plaque de LB agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 34 µg/ml de chloramphenicol.
- Un Erlenmeyer contenant 500 ml de milieu LB et les deux antibiotiques est inoculé avec une colonie, puis incubé sous agitation (240 rpm) à 22°C pendant 20 heures afin d'obtenir une concentration cellulaire dense, mais si possible pas saturée. Cette préculture sert à inoculer le fermenteur contenant les 10 litres de LB + antibiotiques. La croissance est poursuivie à 22°C, sous agitation (500 rpm) et avec une aération de 18 litres d'air par minutes.

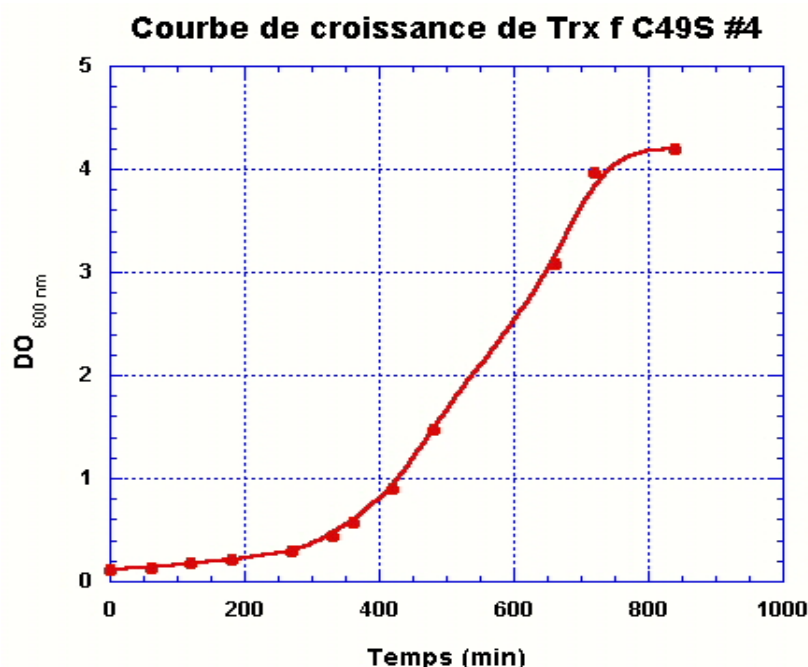


Figure 50. Courbe de croissance de la culture BL21 DE3 pLysS-pET Trx f C49S #4.

L'induction est faite quand la densité optique à 600 nm est de ~1 avec 0,5 mM IPTG et les bactéries sont récoltées 4-5 heures après.

- Centrifuger la culture (SLA, 10 min, 4000 g, 4°C).
- Resuspendre les culots dans la solution hypertonique et laisser sous agitation lente (10 min, 4°C).
- Centrifuger (SLA, 10 min, 10 000 g, 4°C).
- Resuspendre les culots dans la solution hypotonique et laisser sous agitation lente (15 min, 4°C).
- Centrifuger (SLA, 10 min, 10 000 g, 4°C).
- Filtrer la solution de protéines sur un filtre Whatmann.
- Charger la SP-sépharose.

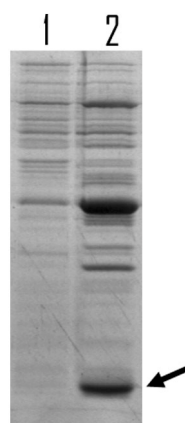


Figure 51. Gel SDS-PAGE présentant le contenu en protéines de la solution hypertonique (1) et hypotonique (2). La flèche indique la Trx f.

SP-sépharose

Equilibration: 1000 ml de tampon 50 mM acide malonique pH 6.0
+ 14 mM MET (tampon A)

Programme

Lavage: 400 ml de tampon A
Elue toute les protéines non-fixées
5 fractions de 75 ml

Gradient: 1000 ml tampon A et 1000 ml tampon A + 200 mM NaCl
Gradient linéaire de 2000 ml
80 fractions de 24 ml

Nettoyage: 250 ml de tampon A + 1 M NaCl
Elue toutes les protéines encore présentes sur la résine
10 fractions de 24 ml

Collecteur Frac-300 Rack mode et volume
Pompe P-1, Position 4.5 x 10, tuyau Ø 3.1 mm
250 ml/h, 0.86 ml/pulse

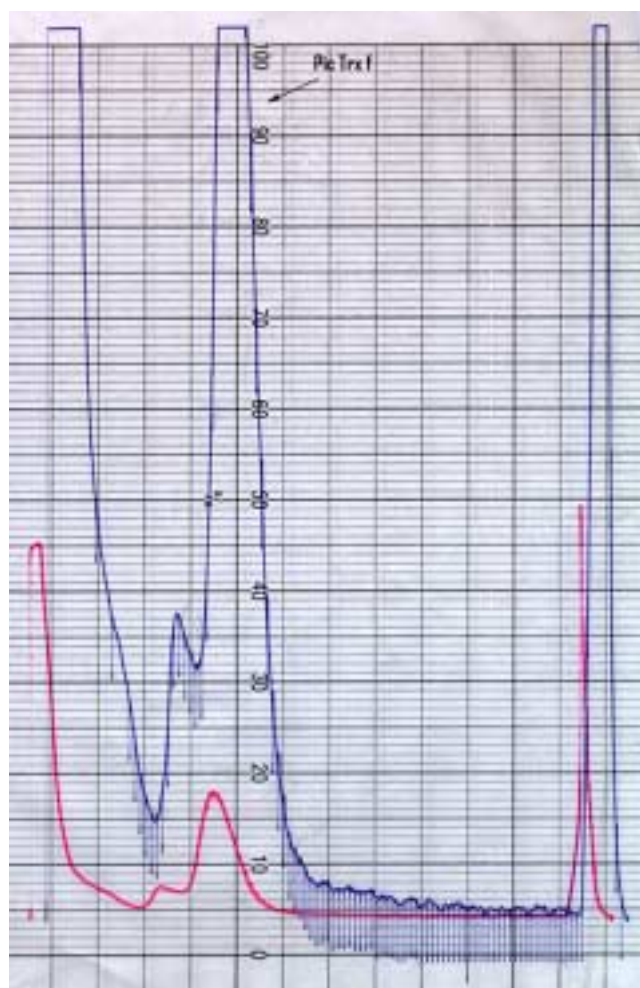


Figure 52. Profil de la séparation de l'extrait de protéines du choc contenant la Trx f C49S sur la colonne échangeuse de cations SP-sépharose. Le pic contenant la Trx f C49S est marqué.

Fractions collectées: 14-30,
volume: 340 ml
 $A_{280 \text{ nm}}$: 0.425 cm^{-1}

- Réunir les fractions contenant la Trx f
- Concentrer dans une cellule Amicon sur une membrane YM10 jusqu'à un volume inférieur à 20 ml.
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 20 min, 4 °C).
- Charger les protéines sur la Sephadex G-50

Tamissage moléculaire Sephadex G-50

Tampon: 50 mM MES-NaOH pH 6.1
+ 50 mM NaCl
+ 14 mM MET

Collecteur LKB Pompe Perplex 3/100, Tuyau Ø 1.15 mm, Débit 25 ml/h
12 min/fract, 80 fractions, tubes de 12 ml

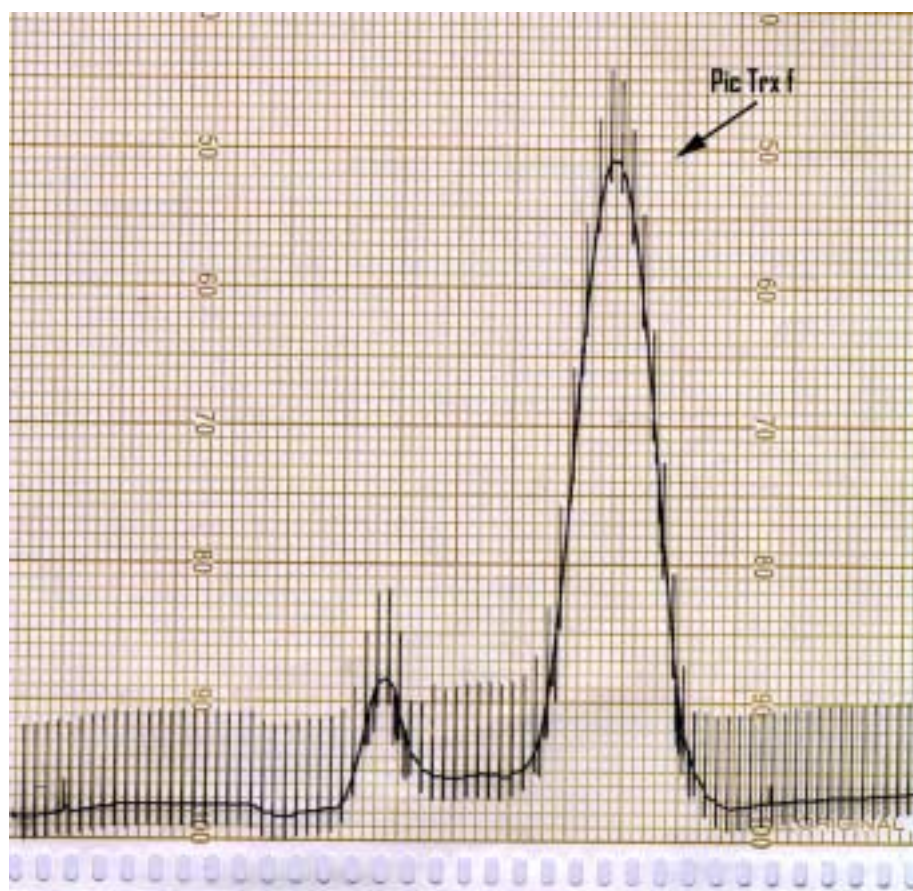


Figure 53. Profil d'élution de la colonne de tamissage moléculaire Sephadex G-50. Le pic contenant la Trx f C49S est marqué.

Fractions collectées: 46-61
Volume: 86 ml
 $A_{280 \text{ nm}}: 1.23 \text{ cm}^{-1}$

- Réunir les fractions contenant la Trx f.
- Concentrer et diafiltrer dans une cellule Amicon et avec du tampon 50 mM MES-NaOH pH 6.1 + 14 mM MET.
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 20 min, 4 °C).

Le spectre UV de cette solution de protéines permet la détermination de la concentration de Trx f avec le coefficient d'extinction calculé de $14\,230\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

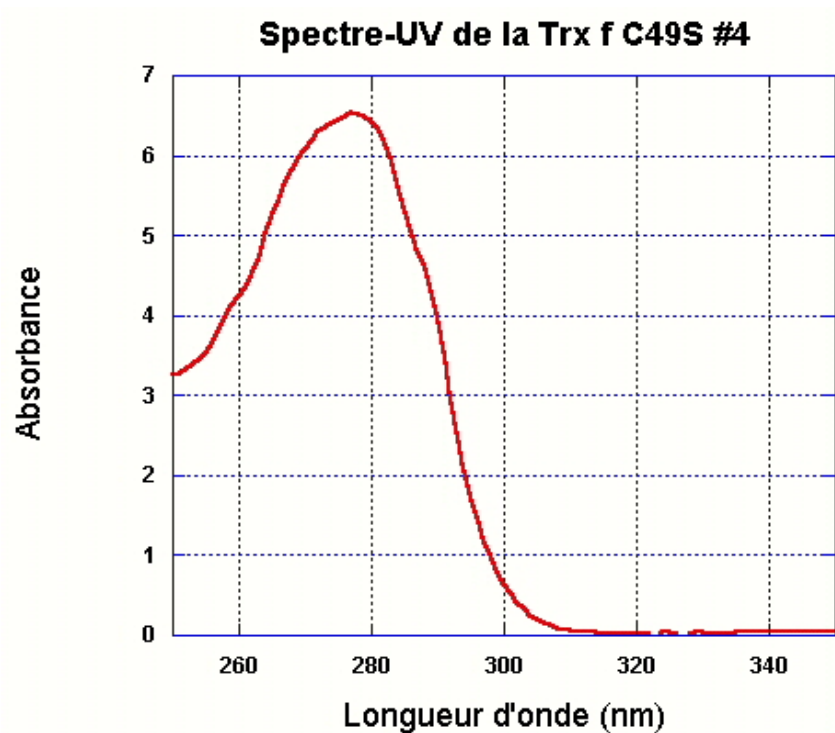


Figure 54. Spectre-UV final de la purification de la Trx f C49S #4. La Trx f C49S est dans le tampon 50 mM MES-NaOH pH 6.1 + 14 mM MET.

Fin de la purification
Volume: 15.5 ml
 $A_{280\text{ nm}}: 6.5\text{ cm}^{-1}$

Concentration : 450 μM

12 Annexe 2: Expression et purification de la FBPase WT #5

- Les bactéries compétentes BL21 DE3 pLysS sont transformées avec le plasmide pET 3d FBPase WT, puis incubées 12 heures à 37 °C sur une boîte LB Agar + ampicilline et chloramphénicol. La préculture de 500 ml est également incubée 12 heures à 37 °C sous agitation (240 rpm) puis est injectée dans le fermenteur de 10 litres.

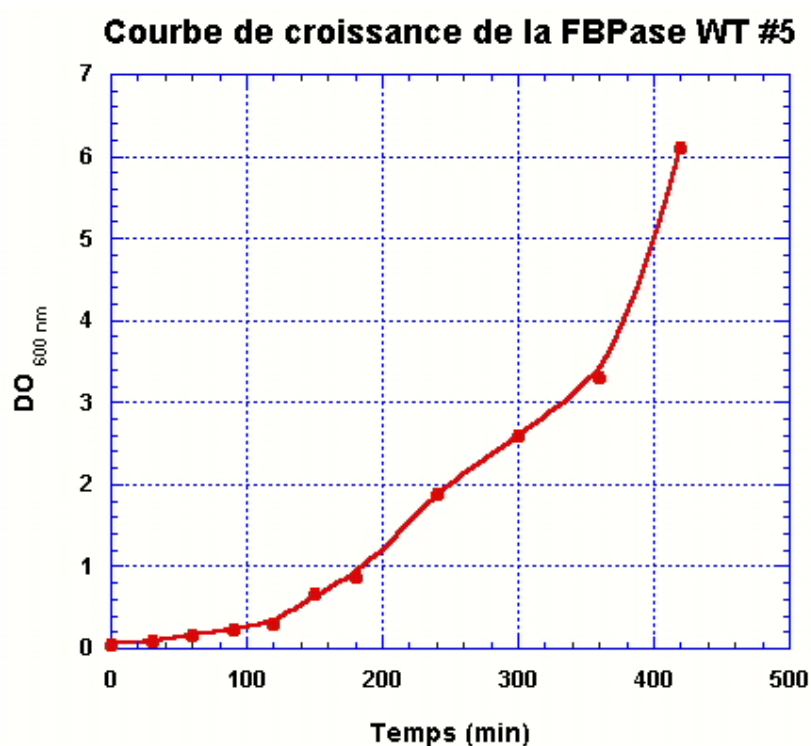


Figure 55. Courbe de croissance de la culture BL21 DE3 pLysS-pET FBPase WT #5. L'induction est faite quand la densité optique à 600 nm est de ~0.8 avec 0.5 mM IPTG et les bactéries sont récoltées 4-5 heures après.

- Récolter les bactéries par centrifugation (SLA, 10 min, 4000 g, 4 °C).
- Congeler les culots une nuit à -20 °C, puis décongeler.
- Traiter la solution à la Benzonase.
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 15 min, 4 °C).
- Abaisser le pH à 5.2 avec de l'acide formique dilué.
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 15 min, 4 °C)
- Remonter le pH à 5.5.
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 20 min, 4 °C)
- Charger la solution de protéines sur la Q-sépharose

Q-séparation

Equilibration:	1000 ml de tampon 50 mM Na-acétate pH 5.5 (Tampon A)
Elution	
Gradient:	1000 ml tampon A et 1000 ml tampon A + 800 mM NaCl Gradient linéaire de 2000 ml 75 fractions de 24 ml
Nettoyage:	250 ml de tampon A + 1 M NaCl Elue toutes les protéines encore présentes sur la résine 10 fractions de 24 ml
Collecteur Frac-300	Rack mode et volume Pompe P-1, Position 3.0 x 10, tuyau Ø 3.1 mm 175 ml/h, 0.76 ml/pulse

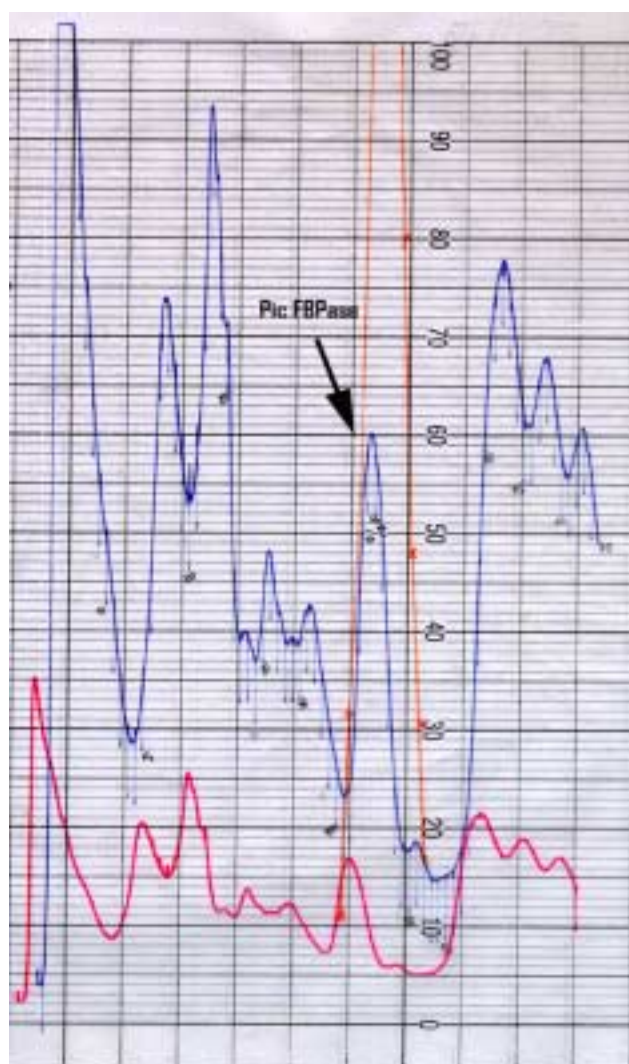


Figure 56. Profil de la séparation de l'extrait de protéines totales de la culture FB Pase WT sur la colonne échangeuse d'anions Q-séparation. Le pic contenant la FB Pase est marqué.

Fractions combinées: 43-50
Volume: 165 ml
 $A_{280 \text{ nm}}: 2.15 \text{ cm}^{-1}$

355 mg de protéines totales

- Réunir les fractions actives.
- Monter le pH à 7.0 avec du K_2HPO_4 1 M.
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 15 min, 4 °C).
- Charger les protéines sur la colonne HAP.

Hydroxyapatite

Equilibration:	250 ml de tampon 20 mM KPi pH 7.0 (Tampon A)
Elution	
Gradient:	250 ml tampon A et 250 ml 200 mM KPi pH 7.0 Gradient linéaire de 500 ml 40 fractions de 12 ml
Nettoyage:	250 ml de KPi 500 mM Elue toutes les protéines encore présentes sur la résine
Collecteur LKB	Pompe Perpex 8/125, tuyau \varnothing 1.3 mm 73 ml/h, 10 min/frac

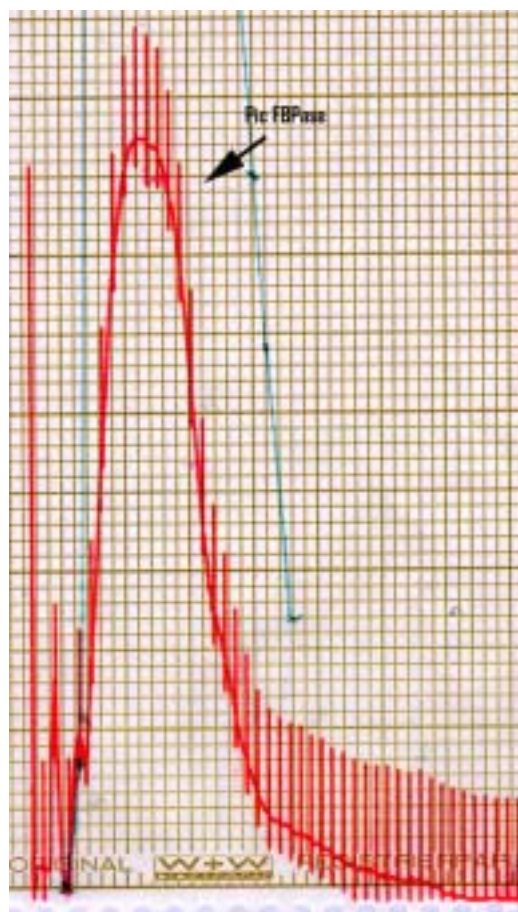


Figure 57. Profil d'élution de la colonne hydroxyapatite (étape additionnelle). Le pic de la FBPase est marqué.

Fractions combinées 6-22

Volume: 180 ml

$A_{280\text{ nm}}$: 1.86 cm^{-1}

334 mg de protéines totales

- Réunir les fractions actives.
- Précipiter les protéines totales au sulfate d' ammonium (95% de saturation).
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 15 min, 4 °C).
- Resuspendre les culots de protéines dans un volume minimal de tampon 50 mM Na-acétate pH 5.5 (il n'est pas nécessaire de rajouter du glucose pour alourdir la solution de protéines, le sulfate d' ammonium résiduel est suffisant).
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 15 min, 4 °C).
- Charger les protéines sur la S-200.

Tamissage moléculaire S-200

Tampon: 50 mM Na-acétate pH 5.5
+ 50 mM NaCl

Collecteur LKB Pompe Perpex 1/10, tuyau Ø 1.15 mm
90 ml/h, 8 min/frac, 110 tubes

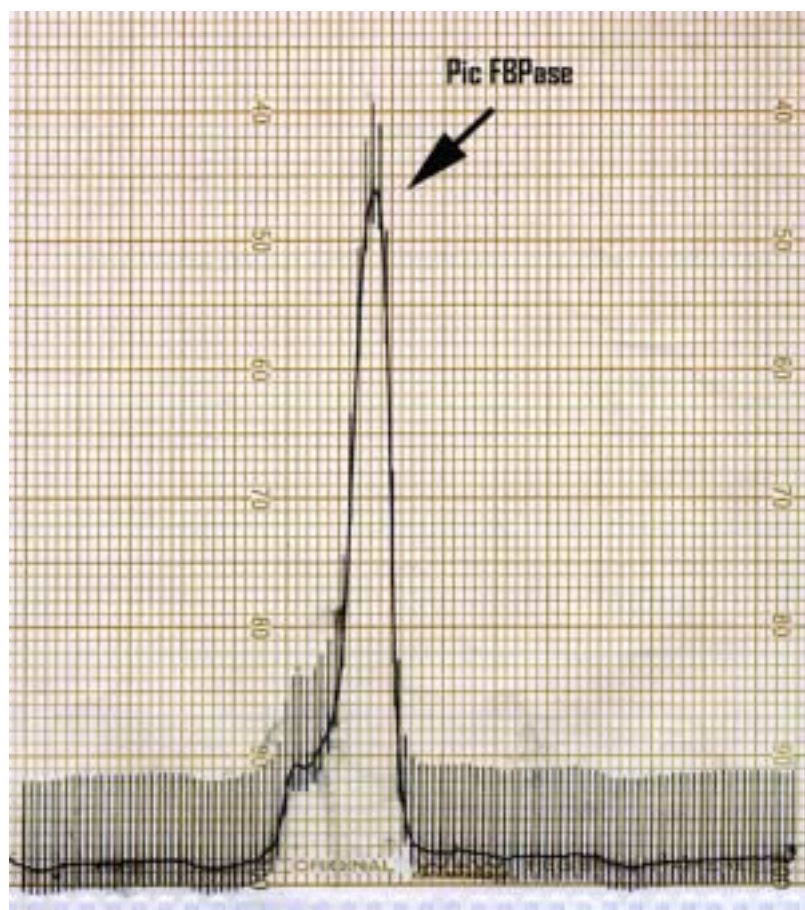


Figure 58. Profil d'élution de la colonne de tamissage moléculaire S-200. Le pic contenant la FBPase est marqué.

Fractions combinées: 46-58

Volume: 141 ml
 $A_{280 \text{ nm}}: 1.7 \text{ cm}^{-1}$

240 mg de protéines totales

- Réunir les fractions actives.
- Concentrer et diafilter dans une cellule Amicon avec une membrane XM50 et du tampon 50 mM Na-acétate pH 5.5.
- Centrifuger (SS-34, 48 000g, 20 min, 4 °C).

La concentration de la solution finale de FBPase WT #5 est déterminée au spectrophotomètre en utilisant le coefficient d'extinction de $144\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour la longueur d'onde de 279 nm. De plus l'activité est également déterminée ce qui permet finalement de calculer l'activité spécifique.

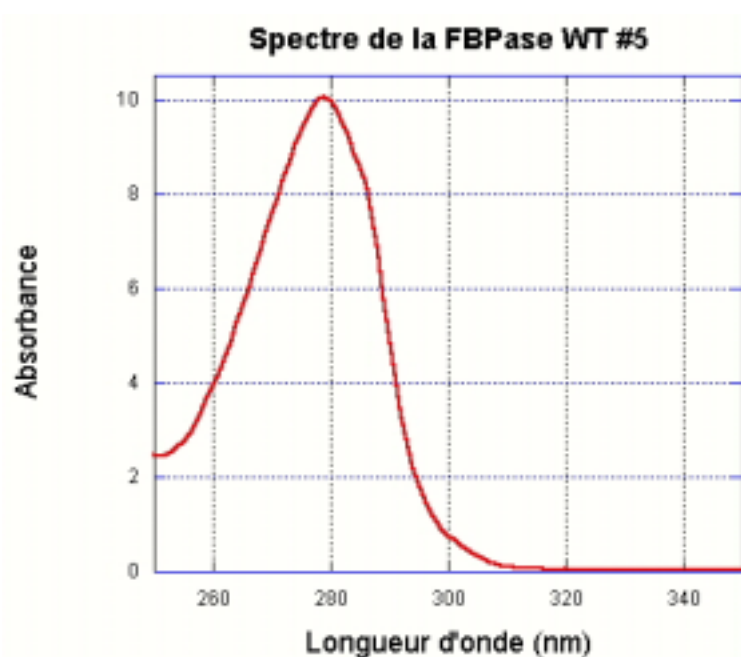


Figure 59. Spectre-UV final de la purification de la FBPase WT #5. La FBPase WT est dans le tampon 50 mM Na-acétate pH 5.5.

Fin de la purification
Volume: 22 ml
 $A_{280\text{ nm}}$: 10 cm^{-1}

Concentration: **70 μM**
220 mg de protéines totales
Activité moyenne: 1.73 U/ μl
Activité totale: 38 060 U
Activité spécifique: **173 U/mg**