

1333

**MUTAGENÈSE DIRIGÉE DE LA PLASTOCYANINE D'ÉPINARD ET
ÉTUDE COMPARATIVE DU TRANSFERT D'ÉLECTRONS AVEC DES
COMPLEXES OPTIQUEMENT ACTIFS DE COBALT(II)
ET DE LA STABILITÉ EN PRÉSENCE D'IMIDAZOLE**



Charly Nusbaumer

Neuchâtel 1996

Université de Neuchâtel

Faculté des Sciences

**MUTAGENESE DIRIGEE DE LA PLASTOCYANINE D'EPINARD ET
ETUDE COMPARATIVE DU TRANSFERT D'ELECTRONS AVEC DES
COMPLEXES OPTIQUEMENT ACTIFS DE COBALT(II)
ET DE LA STABILITE EN PRESENCE D'IMIDAZOLE**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

CHARLY NUSBAUMER

Biologiste diplômé de l'Université de Neuchâtel

pour l'optention du grade de

Docteur ès sciences

Institut de Chimie

Université de Neuchâtel

1996

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Mutagenèse dirigée de la plastocyanine d'épinard et étude comparative du transfert d'électrons avec des complexes optiquement actifs de cobalt (II) et de la stabilité en présence d'imidazole

de M. Charly Nusbaumer

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

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

Messieurs K. Bernauer, P. Schürmann,
R. Neier et J. Kägi (Zürich)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 8 octobre 1996

Le doyen:

R. Dändliker

R. Dändliker

Remerciements

Ce travail a été effectué dans les laboratoires de Biochimie Végétale et de Chimie Inorganique et Analytique de l'Université de Neuchâtel, d'avril 1993 à septembre 1996.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mes deux directeurs de thèse les Professeurs K. Bamauer et P. Schürmann. Leur intérêt pour mon travail, leur disponibilité ainsi que leurs qualités humaines ont été pour moi sources de motivation.

Je remercie également Messieurs les Professeurs R. Naier (Université de Neuchâtel) et J. Kägi (Université de Zürich) pour avoir bien voulu faire partie du jury de ma thèse.

Parmi tous mes collègues de travail, qui trouveront dans ces lignes l'expression de mes plus chaleureux remerciements pour l'ambiance, la joie et le soutien qu'ils m'ont apporté durant ce travail, je tiens à relever l'amitié partagée avec Grégoire Dal Val et Luca Varado. Un merci tout particulier leur est ici adressé.

Mes remerciements s'adressent également aux laborantines et laborantins du laboratoire de Biochimie Végétale (Anna-Lise, Laurence, Soraya, Sandra et Bastian) dont la disponibilité et la bonne humeur ont toujours été très appréciées.

Je remercie la confédération qui par la FNRS m'a accordé le financement de mon travail.

Table des matières

INTRODUCTION

Chapitre 1	Introduction	
1.1	Avent-propos	p. 1
1.2	Buts du travail	p. 2
1.2.1	Transfert d'électrons	p. 2
1.2.2	Stabilité du site de coordination du cuivre de la plastocyanine en présence d'imidazole	p. 3
1.3	Description du système	p. 3
1.3.1	Plastocyanine	p. 3
1.3.1.1	Rôle biologique	p. 4
1.3.1.2	Structure	p. 7
1.3.1.3	Aspects réactionnels	p. 13
1.3.1.3.1	Réactivité avec les partenaires physiologiques	p. 13
1.3.1.3.2	Réactivité avec de petites molécules inorganiques	p. 16
1.3.2	Complexes utilisés	p. 17
1.4	L'ADN recombinant et la génie génétique des protéines	p. 21
1.4.1	Biologie moléculaire de la plastocyanine	p. 22
1.5	L'Azurine: structure, fonction et génétique	p. 25

PARTIE BIOCHIMIQUE**Chapitre 2 Techniques d'ADN recombinant et génie des protéines.**

2.1 Généralités	p. 29
2.1.1 Librairies génomiques	p. 29
2.1.2 Une méthode de choix pour l'isolement des gènes: le PCR.	p. 30
2.1.3 Expression dans <i>E. coli</i>	p. 31
2.1.3.1 Vecteurs	p. 31
2.1.3.2 Promoteurs	p. 32
2.1.3.3 Stabilité des ARN messagers	p. 33
2.1.3.4 Usage des codons	p. 33
2.1.3.5 Protéolyse	p. 33
2.1.4 Purification des protéines	p. 34
2.2 Méthodes générales de génie génétique	p. 34
2.2.1 Préambule	p. 34
2.2.2 Souches et vecteurs	p. 34
2.2.3 Amorces (primers) utilisé dans ce travail	p. 35
2.2.4 Sources d'ADN matrice (DNA template) utilisé dans ce travail	p. 35
2.2.5 Source des anticorps α -plastocyanine	p. 35
2.2.6 Digestion, élution et sous-clonage de fragments d'ADN	p. 37
2.2.6.1 Digestion de l'ADN	p. 37
2.2.6.2 Elution des fragments d'ADN	p. 37
2.2.6.3 Préparation des vecteurs pour le sous-clonage	p. 37
2.2.6.4 Préparation des fragments PCR pour le sous-clonage	p. 38
2.2.6.5 Ligation et transformation	p. 38

2.2.6.6 Isolement de l'ADN de plasmides	p. 39
2.2.7 Polymérisation en chaîne (PCR)	p. 39
2.2.7.1 Marquage terminal d'oligonucléotides per la T4 polynucléotide kinase	p. 40
2.2.7.2 Séquençage de l'ADN double brin par PCR	p. 40
2.3 Stratégie générale	p. 41
2.3.1 Stratégie de clonage	p. 42
2.3.2 Construction de la chimère	p. 42
2.3.3 Mutagénèse dirigée	p. 43
2.4 Méthodes générales pour le génie des protéines	p. 45
2.4.1 Milieux de culture	p. 45
2.4.2 Fermenteurs	p. 46
2.4.3 Conditions de culture	p. 47
2.4.4 Centrifugation en continu	p. 47
2.4.5 Choc osmotique	p. 48
2.4.6 Précipitation au sulfate d'ammonium	p. 49
2.4.7 DEAE-cellulose (DiEthyl-Amino-Ethyl-cellulose)	p. 50
2.4.8 Tamisage moléculaire	p. 51
2.4.9 Echangeur d'ions sur FPLC	p. 51
2.4.10 Système de concentration des solutions de protéines	p. 51
2.4.11 La purification de l'azurine recombinante	p. 52
2.4.12 Techniques d'électrophorèse pour les protéines	p. 52
2.4.13 Méthode rapide de coloration des gels SDS	p. 55
2.4.14 Méthode rapide de coloration des gels IF	p. 56

Chapitre 3	Résultats de la partie biochimique	
3.1	En biologie moléculaire	p. 57
3.1.1	Construction de la chimère AzPc	p. 57
3.1.2	Mutagenèse dirigée	p. 60
3.2	En biochimie	p. 61
3.2.1	Production de l'azurine	p. 61
3.2.2	Production de la plastocyanine	p. 63
3.2.2.1	Tests des conditions d'expression	p. 63
3.2.2.2	Résultats des expériences établissent le chemin final de purification	p. 67
3.2.2.3	Détails des résultats de la production d'une plastocyanine	p. 70
3.2.2.4	Résultats globaux de la purification des différents mutants de la plastocyanine	p. 74
PARTIE CHIMIQUE		
Chapitre 4	Transfert d'électrons	
4.1	Introduction	p. 77
4.2	Les cinétiques du transfert d'électrons	p. 77
4.2.1	Solutions de mesures	p. 80
4.2.2	Réactions avec Δ -[Co ^{II} (R,R)-promp] et Λ -[Co ^{II} (S,S)-promp]	p. 81
4.2.3	Discussion	p. 86
4.2.4	Réactions avec Δ -[Co ^{II} (R,R)-alamp] et Λ -[Co ^{II} (S,S)-alamp]	p. 87
4.2.5	Discussion	p. 96

4.3	Fixation des complexes de Co^{III} pendant le transfert d'électrons	p. 101
4.3.1	Essais de fixation avec $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-promp}]$ et $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{S,S})\text{-promp}]$	p. 103
4.3.2	Essais de fixation avec $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$ et $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{S,S})\text{-alamp}]$	p. 105
4.3.3	Discussion	p. 109
4.3.4	Expériences d'interruption des réactions (quenching)	p. 110
4.3.4.1	Introduction	p. 110
4.3.4.2	Résultats	p. 111
4.3.4.3	Discussion	p. 117
4.4	Tentatives de caractérisation de l'équilibre entre Pc et Pc'	p. 118
4.5	Discussion comparative des cinétiques de transfert d'électron et des mesures de fixation pour les différents mutants	p. 121
Chapitre 5	Stabilité de la plastocyanine dans un tampon imidazole	
5.1	Introduction	p. 129
5.2	Séquestrations du $\text{Cu}(\text{II})$ des plastocyanines par l'imidazole	p. 130
5.3	Discussion	p. 140
Chapitre 6	Conclusion	p. 145
Chapitre 7	Résumé	p. 147
Chapitre 8	Bibliographie	p. 149
Annexe 1		p. 155
Annexe 2		p. 159
Annexe 3		p. 163
Annexe 4		p. 165
Annexe 5		p. 169

1. Introduction

1.1 Avent-propos

Depuis près d'un demi-siècle, l'évolution conduit les sciences naturelles vers une plus grande interdisciplinerité. Les nouvelles disciplines hybrides, comme la chimie bioorganique ou bioinorganique, ont une place de plus en plus grande dans le monde de la recherche. Preuve en est la création de leurs propres sociétés. Ces disciplines ont comme effet positif d'abolir des barrières entre les domaines et d'en réunir les chercheurs.

Elles mettent, entre autres, au profit de la synthèse chimique une partie de la batterie enzymatique des systèmes vivants. Elles permettent d'approcher le niveau moléculaire de processus aussi complexes que la photosynthèse, la phosphorylation oxydative ou la fixation d'azote, etc...

Une approche fréquemment utilisée est basée sur l'emploi de modèles. Le système naturel est en effet généralement trop compliqué pour qu'il soit possible d'en étudier une propriété isolée. Des systèmes artificiels ou semi-artificiels -intégrant un élément naturel- de structure simple sont synthétisés afin de reproduire une propriété particulière du système naturel, dont l'étude sera alors plus facile.

Suite au progrès du génie génétique et parallèlement à l'emploi de modèles, ces dernières années voient la généralisation de l'utilisation de mutants des systèmes naturels. Mutants et modèles semi-artificiels permettent une approche combinée des problèmes, en variant à la fois la partie artificielle et naturelle du système étudié.

1.2 Buts du travail

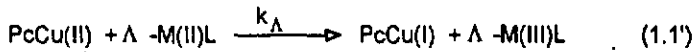
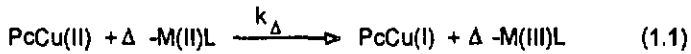
1.2.1 Transfert d'électron

Une des caractéristiques les plus importantes des systèmes enzymatiques est leur stéréosélectivité [1].

Ce projet concerne l'étude des interactions chirales qui ont lieu à l'interface d'une molécule de protéine et d'un petit réactif optiquement actif. La nature et l'importance de la reconnaissance moléculaire sont étudiées en mesurant la cinétique du transfert

d'électrons entre la plastocyanine, une protéine de cuivre bleu, et des complexes métalliques optiquement actifs.

La stéréosélectivité du transfert d'électrons se traduit par une différence dans les vitesses de réduction entre les deux énantiomères selon les équations (1.1) et (1.1')



L'évaluation de cette stéréosélectivité est donnée par le rapport k_{Δ} / k_{Λ} qui, à son tour est une expression de la différence de l'énergie d'activation ΔG^{\ddagger} . Le premier transfert d'électron stéréosélectif a été observé entre la plastocyanine et les complexes de fer(II) optiquement actifs $\Lambda\text{-[Fe}^{\text{II}}(\text{S,S})\text{-alamp]}$ et $\Delta\text{-[Fe}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp]}$ par Bernauer et Seuvein [2]. Les complexes formés à partir des ligands développés par le groupe Bernauer ont montré également un tel comportement avec d'autres metalloprotéines. Le transfert d'électron est en effet stéréosélectif lors de la réduction du cytochrome c en présence des complexes de fer(II) formés par les ligands phemp, elamp et promp [3] ainsi que lors de l'oxydation de la ferrédoxine par les complexes de cobalt(III) formés par les ligands elemp et promp [4]. Pour ces trois systèmes, des mesures en fonction de la température ont montré un phénomène compensatoire dans les variations de l'enthalpie et de l'entropie d'activation. En effet, l'énantiomère possédant la plus faible enthalpie d'activation possède également l'entropie d'activation la plus négative. Par conséquent, la stéréosélectivité est fortement fonction de la température. Ce comportement a été interprété par un ΔH^{\ddagger} élevé, signe d'une bonne reconnaissance chirale et d'une liaison plus forte de la paire redox, ce qui conduit à une plus grande désolvatation et donc à un ΔS^{\ddagger} plus positif.

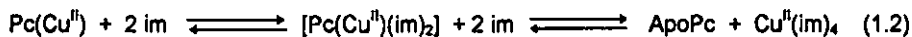
Le présent projet se focalise sur l'influence des modifications (par génie génétique) de la chiralité de la protéine elle-même.

Le transfert d'électrons entre la plastocyanine et des réactifs neutres ou chargés négativement prend place, dans une poche hydrophobe (the remote site) située au "sommet" de la molécule, à quelque 6 Å de l'atome de cuivre, mais sans contact direct avec ce dernier. Leucine 12, un des acides aminés localisés près du centre de la poche et qui est en contact avec le photosystème I (PS I), sera remplacé par génie génétique.

Le détermination des paramètres d'activation (ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger) des réactions de transfert d'électrons avec des plastocyanines modifiées génétiquement et des réactifs optiquement actifs pourra donner un meilleur aperçu des exigences énergétiques des réactions de transfert d'électrons faisant intervenir des biomolécules, spécialement en respectant l'importance du réarrangement du solvant.

1.2.2 Stabilité du site de coordination du cuivre de la plastocyanine en présence d'imidazole

Le travail de Verrardo a montré que la plastocyanine réagit en présence d'imidazole (im) selon l'équation (1.2), [5].



Le ligand imidazole prend la place des acides aminés liant le cuivre dans la plastocyanine. Il en résulte un équilibre de répartition du cuivre entre l'apoprotéine et l'imidazole.

Il s'agit ici de déterminer l'impact des différentes mutations sur la stabilité de la plastocyanine en présence d'imidazole, ainsi que sur la cinétique des deux équilibres de l'équation (1.2).

1.3 Description du système

1.3.1 Plastocyanine

Parmi les réactions biologiquement importantes, le transfert d'électrons (TE) tient une très grande place (photosynthèse, phosphorylation oxydative...), car il est à la base de la production de l'énergie, sans laquelle il n'y a pas de vie. Généralement, ces réactions se composent d'une suite de TE en cascade, l'électron étant transféré d'une protéine (ou d'un complexe protéique) fixé dans une membrane à une autre protéine fixe (ou un complexe protéique) par l'intermédiaire d'une série de transporteurs d'électrons.

La plastocyanine est la mieux caractérisée de la classe des petites protéines bleues, qui regroupe entre autre l'azurine, la pseudoazurine et l'armicyanine [6]. Son nom provient de sa couleur bleue et de sa localisation dans le chloroplaste. Son rôle spécifique est de participer, comme transporteur d'électrons, à la photosynthèse des plantes vertes [7].

photosynthèse dite oxygénique, libérant de l'oxygène par l'action du photosystème II (PS II) sur deux molécules d'eau.

La plastocyanine n'apparaît pas dans le premier processus photosynthétique (anoxygénique) élaboré par les bactéries, où la source d'électron pour le PS I n'est pas l'eau mais des composés organiques ou inorganiques réduits, comme l'acide malique, l'acide acétique, le méthanol, le sulfure d'hydrogène (H_2S) ou l'hydrogène (H_2). Ce n'est que plus tard que les bactéries ont développé avec le PS II la capacité d'oxyder l'eau. Cette capacité offre aux organismes photosynthétiques un plus large spectre de milieux colonisables, l'eau étant un composé ubiquiste.

Suite à la première isolation et description de la plastocyanine de l'algue bleue *Chlorella allipsoidea* par Katoh en 1960 [8], la structure primaire de la protéine a été déterminée pour plus de trente espèces de plantes supérieures, d'algues vertes et de bactéries photosynthétiques. L'homologie entre ces différentes plastocyanines est estimée en comparant le nombre d'acides aminés conservés. Les similitudes entre les plastocyanines des plantes sont très nombreuses. La comparaison des plastocyanines de 67 plantes montre 64 acides aminés conservés sur un total de 99. Cependant, la séquence de la plastocyanine de trois algues est considérablement moins conservée. La forte homologie et la présence de nombreux acides aminés invariablement conservés indiquent que la conformation doit être essentielle pour le fonctionnement de la protéine.

Boulter et al. (1977) [9] Guss et Freemann (1983) [10] Sykas (1985,1991) [11,12] et Briggs et al. (1990) [13] ont compilé l'ensemble des séquences connues de plastocyanine.

1.3.1.1 Rôle biologique

Dans les plantes supérieures, les réactions primaires de la photosynthèse ont lieu dans la membrane du thylacoïde à l'intérieur du chloroplaste (Fig. 1). On appelle "réactions primaires" les étapes liées à la production d'énergie, les "réactions secondaires" étant celles du processus de fixation du CO_2 . Différents complexes protéiques sont enchâssés dans la membrane thylacoïdale, les trois principaux complexes sont le photosystème II, le cytochrome *b6/f* et le photosystème I. Ils n'interagissent pas directement mais via de petits transporteurs d'électron. La liaison entre le cytochrome et le PS I est assurée par la plastocyanine, alors que PS II et cytochrome sont reliés par des plastoquinones (Fig 2).

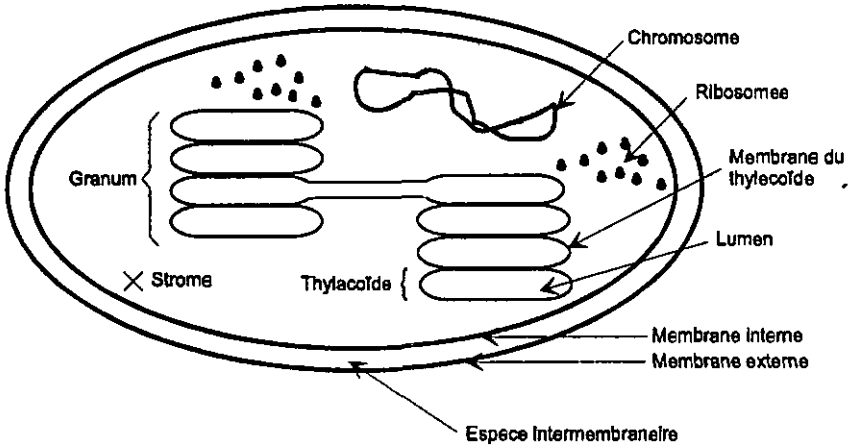


Fig. 1: Coupe échématique d'un chloroplaste.

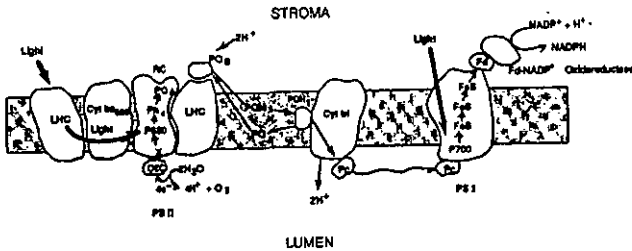


Fig. 2: Schéma de la membrane d'un thylakoïde.

La plastocyanine est une protéine hydrosoluble localisée dans le lumen, comme l'a montré Heuska [14]. A l'aide de réactions d'inhibition, il a été proposé que la plastocyanine soit réduite par le PS II et oxydée par le PS I [15]. De plus, étant donné que le potentiel redox de la plastocyanine est de + 370 mV [16], la position de la protéine doit être très proche du PS I (Fig. 3). Il est actuellement établi que la plastocyanine est le donneur d'électron spécifique du PS I, et que son réducteur est le cytochrome f. Cependant dans quelques algues comme *Chlamydomonas* et *Scenedesmus* et chez plusieurs souches de *Chlorella*, la plastocyanine est remplacée par le cytochrome c-553 soluble, si leur milieu est carencé en cuivre [17].

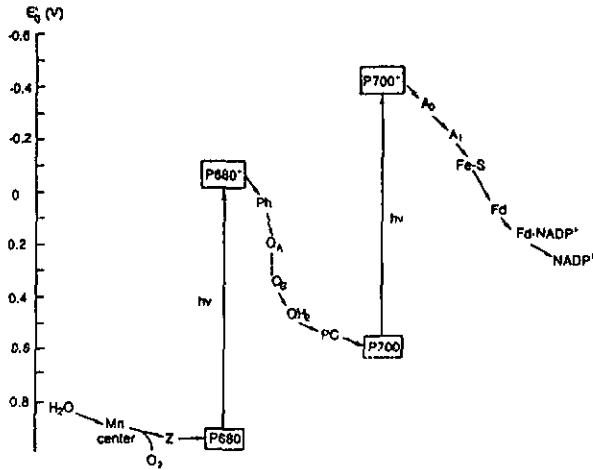


Fig. 3: La chaîne en Z, suite des réactions redox de la photosynthèse en fonction de E'_0 .

Le centre réactionnel du PS I est organisé en complexes protéines-chlorophylle. Il est formé de six polypeptides différents numérotés de I à VI selon leur taille (Fig. 4). Le P700 composé de deux sous-unités I traverse la membrane du thylacoïde de part en part. Chaque sous-unité contient un accepteur primaire des électrons et environ 20 molécules de chlorophylles a, organisées dans une forme semi-cristalline. Les polypeptides IV, V et VI avec chacun un centre 4Fe-4S, servent de relai pour les électrons depuis l'accepteur primaire jusqu'à la ferrédoxine et sont situés du côté externe de la membrane. Le polypeptide III placé du côté interne de la membrane joue, selon Wynn et Melkin [18], un rôle important dans la reconnaissance du site de réaction pour la plastocyanine. En effet, lorsqu'il est absent, le transfert d'électrons entre la plastocyanine et le P700 n'a plus lieu.

Des études de réactivité entre une plastocyanine modifiée (chimiquement ou génétiquement) [12,19] et ses partenaires redox (Cyt f et PS I) ont montré le rôle prépondérant des interactions électrostatiques pour un transfert d'électron efficace. Ces études ont également démontré l'existence de deux sites de liaison (adjacent site et remote site) pour les partenaires de la plastocyanine.

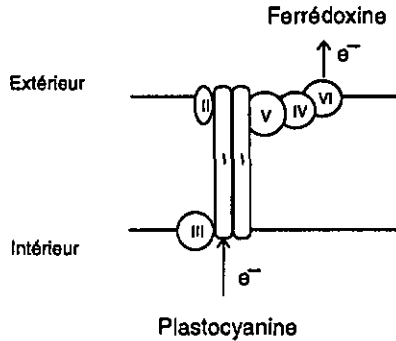


Fig. 4: Modèle du centre de réaction du PS I, structure et fonction.

1.3.1.2. Structure

La plastocyanine est une protéine cuivre bleu (type 1) de 99 acides aminés (Fig. 5) soit environ 10 kD [20] et 40 x 32 x 28 Å.

VEVLLGGGDG SLAFLPGDFS VASGEEIVFK
 NNAGFPHNVV FDEDEIPSGV DAAKISMSEE
QLLNAPGETY KVTLTEKGTY KFYCSPHQGA
 GMVGKVTVN

Fig. 5: Structure primaire de la Pc d'épinard:
 En gras les acides aminés ligands du cuivre.
 Les résidus de la poche négative sont soulignés deux fois,
 ceux de la poche hydrophobe une fois.

La forme oxydée de la plastocyanina est caractérisée par une intense couleur bleue, comme l'indique le spectre UV/vis (Fig. 6). La bande d'absorption à 597 nm est principalement due à un transfert de charge du ligand sur le métal (S(p)-Cu(d_{x2-y2})) [21] mais la forme réduite n'absorbe pas dans la visible. Toutes les deux ont entre 240 et 300 nm des pics et des épaulaments, signature des résidus tyrosine et phénylalanine [11]. Dans cette région l'absorbance de la Pc (Cu II) est environ 70% de celle de la forme Pc (Cu I).

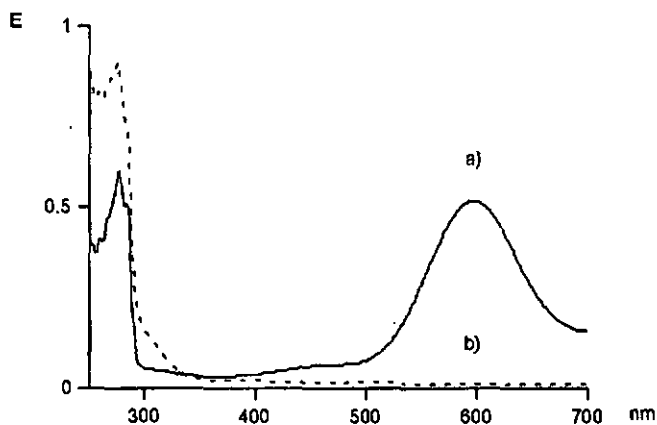


Fig. 6: Spectre UV/Vis de la Pc d'épinard dans l'état oxydé a) et réduit b).

Une propriété supplémentaire est son potentiel rédox. La valeur particulièrement élevée ($E'_0 \text{ Pc} - \text{Cu(I)/Cu(II)} = + 372 \text{ mV}$) [22], comparée à celle du cuivre en solution aqueuse ($E_0 \text{ Cu(I)/Cu(II)} = + 170 \text{ mV}$) est due à la géométrie spéciale du centre de coordination du cuivre. Le pH a une certaine influence sur les propriétés redox de la protéine. Dans le domaine de pH de 6,5 à 9,5 le potentiel est constant (+ 370 mV) (Fig. 7). En dessous de $\text{pH} \approx 6,5$, il augmente lorsque le pH diminue pour atteindre une valeur de + 420 mV à $\text{pH} = 5$ [23] et si la majorité des plastocyanines se dénaturent à $\text{pH} 4$, c'est probablement dû à la protonation des deux histidines 87 et 37 [12].

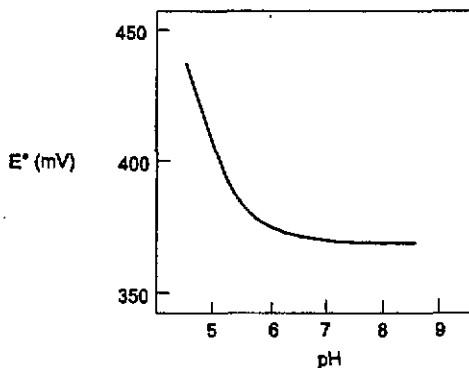


Fig. 7: Variation du potentiel rédox de la plastocyanine isolée de *Petroselinum* sp. (persil) en fonction du pH.

La structure aux rayons-X de la plastocyanine est désormais établie avec une résolution suffisamment fine pour pouvoir localiser tous les atomes des chaînes latérales des acides aminés et les liaisons hydrogène. Cette structure a été établie pour la plastocyanine de peuplier oxydée [24], réduite à six pH différents [25], pour l'apo-plastocyanine [26] et le Hg-plastocyanine (le cuivre est substitué par le mercure) [27]. Récemment la structure cristalline de la plastocyanine de l'algue verte *Enteromorpha prolifera* a été aussi déterminée [28]. De plus la structure des apoplastocyanines de *Senedesmus obliquus* [29] et du haricot [30] a été établie par RMN. La comparaison des conformations cristallines et en solution montre qu'elles sont quasiment identiques. De plus elles ne varient que très peu entre les espèces. On peut se représenter la structure tertiaire comme un cylindre aplati, composé de huit brins (7 feuillet- β et 1 hélice- α) et sept boucles de connection (β -turn), avec à l'extrémité de la molécule un ion métallique (Fig. 8). La faible quantité d'hélices- α observée est en accord avec le spectre CD (Fig. 9) [31].

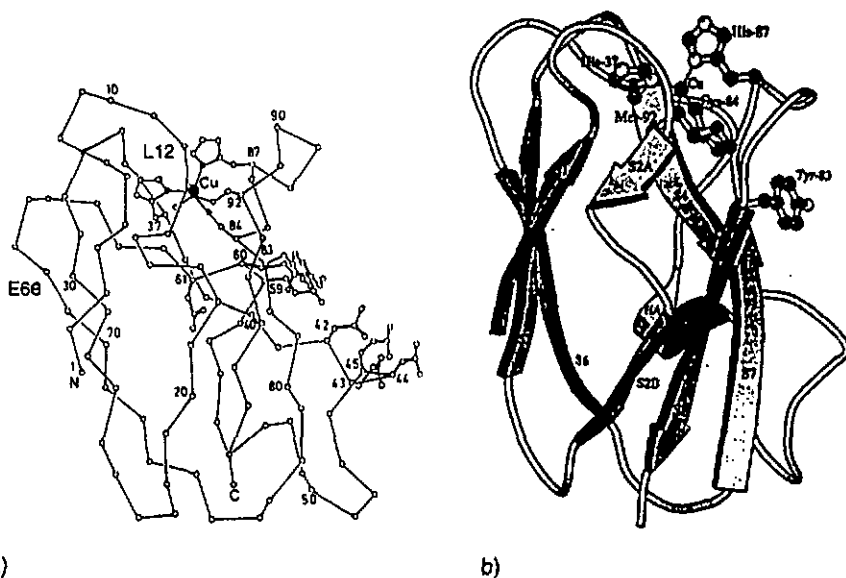


Fig. 8: Structure tertiaire de la Pc de peuplier:

- a) Squelette avec mise en évidence des positions importantes pour ce travail: L12 et E68.
 b) Représentation avec les structures secondaires (feuillet- β et hélice- α).

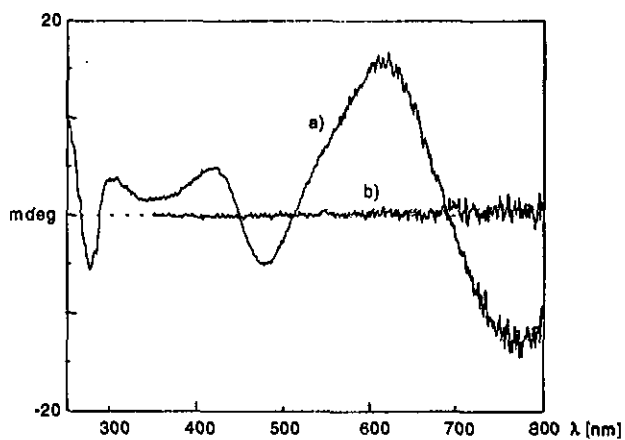


Fig. 9: Spectre CD de la plastocyanine d'éplnard native, a) Pc nt oxydée (250 à 800 nm)
 b) Pc nt réduite (350 à 800 nm).

Parmi les acides aminés conservés (cf. 1.3.1), il en est quatre qui se retrouvent dans toutes les séquences de plastocyanine. Ce sont eux qui coordonnent le cuivre: Histidine 37, Cystéine 84, Histidine 87 et Méthionine 92 à une distance respective de 0.204, 0.213, 0.210 et 0.290 nm (Fig. 10). Il est remarquable que ces acides aminés se situent dans seulement deux régions de la structure primaire, positions 37 et 84 à 92, ce qui impose une géométrie irrégulière au site de coordination du cuivre. Elle dérive d'une géométrie tétraédrique avec une liaison exceptionnellement longue entre le Cu(II) et le S (Met 92) [10]. Cette conformation, responsable des propriétés de la plastocyanine, est stabilisée par un pont hydrogène entre le groupe amine de l'acide aminé conservé Asparagine 38 et le S de la Cystéine 84 [10].

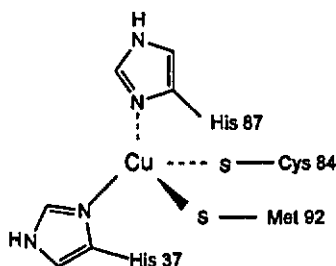


Fig. 10 : Schéma du site actif de la plastocyanine oxydée à pH 7.0.

Le centre métallique est situé dans une poche formée de trois boucles (Fig. 8 b)), composées en majeure partie d'acides aminés conservés hydrophobes. Au centre de cette poche hydrophobe, un bord du cycle imidazole de l'Histidine 87 est exposé au solvant. C'est le seul résidu du site de coordination qui s'étend au-dessus de la surface et le site le plus probable pour un transfert d'électron. L'électron est alors transféré sur une distance de 6 Å. Par ailleurs une séquence conservée de quatre résidus aromatiques semble participer à la suite du transfert des électrons. Elle s'étend à l'intérieur de la molécule depuis le chaîne latérale de Méthionine 92 ligand le cuivre jusqu'à la surface située à l'opposé du centre métallique [10]. Le dernier résidu de cette séquence, Tyrosine 83, est exposé à la surface et entouré de résidus acides (42-45, 59, 61) forment ainsi une région hydrophile. Des études suggèrent que le transfert des électrons pourrait avoir lieu de ce site jusqu'à l'atome de cuivre [32] avec comme site de reconnaissance la région hydrophile (négative) [33].

La compréhension de l'effet d'un pH bas sur la structure et la fonction de la plastocyanine est importante, étant donné que la plastocyanine est localisée dans le lumen du thylacoïde, où le pH atteint des valeurs d'environ 5, après l'illumination des chloroplastes [34]. La structure cristalline de la plastocyanine oxydée ne varie pas dans le domaine de pH de 6 à 4,2 [32]. Par contre, la plastocyanine réduite a deux formes [25], qui prédominent, l'une à pH bas (pH 3,8) et l'autre à pH élevé (pH 7). À des valeurs intermédiaires de pH, il existe un mélange équilibré de ces deux formes. La conformation de la forme à pH élevé est presque identique à celle de la plastocyanine oxydée. La géométrie tétraédrique distordue et la longue distance Cu-Met 92 sont conservées. Cependant, dans la forme à pH bas, la liaison Cu-His 87 est rompue et l'histidine est tournée de 180° autour de la liaison C β - C γ . Cette rupture est le résultat de la protonation de l'histidine 87. Les pK pour l'histidine 87 ont été déterminés par RMN [35] et sont dépendants des espèces. Par exemple, le pK de H87 est 4,9 pour l'épinard et 5,7 pour le persil. La géométrie de coordination du cuivre est alors trigonale planaire. Elle favorise fortement l'état réduit Cu(I), rendant de ce fait cette forme inactive lors des réactions d'oxydoréduction [11].

La structure de l'apoplastocyanine [26] indique que seuls cinq résidus se repositionnent par rapport à la structure de l'holoplastocyanine, PCu(II). Le changement le plus intéressant est celui de l'histidine 87. Bien que sa position soit pratiquement la même que dans PCu(II), le cycle imidazole est tourné de 180° autour de la liaison C β - C γ . La description de ce cycle comme une "porte tournante" suggère que l'incorporation du Cu(II) dans l'apoplastocyanine se déroule en deux étapes: tout d'abord coordination réversible du cuivre sur l'azote du cycle imidazole en contact avec le solvant, suivie de la rotation de ce cycle et de la formation des trois autres liaisons coordinatives. Un tel mécanisme en deux étapes a été indiqué pour deux protéines bleues similaires, la stellacyanine [36] et l'azurine [37].

1.3.1.3. Aspects réactionnels

Les études de la réaction de transfert d'électron impliquant la plastocyanine ont été effectuées avec plusieurs partenaires. Les réactifs utilisés étaient d'une part des protéines, partenaires physiologiques comme le cytochrome *f* ou le P700 ou non physiologiques comme le cytochrome *c* [38,39], l'azurine [40] ou la flavodoxine [41], d'autre part de petites molécules inorganiques "modèles".

1.3.1.3.1. Réactivité avec les partenaires physiologiques:

Les partenaires physiologiques de la plastocyanine sont le Cyt *f* et le P700 (PS I). Basé sur la structure de la protéine et sur la localisation des résidus conservés, Colman (1978) [33] a suggéré deux chemins possibles pour le TE dans la plastocyanine: un via His 87 et l'autre via Tyr 83. Les résidus conservés au voisinage de ces deux positions composent deux poches distinctes: hydrophobe et hydrophile (négative) et suggèrent deux sites de réaction avec les partenaires physiologiques.

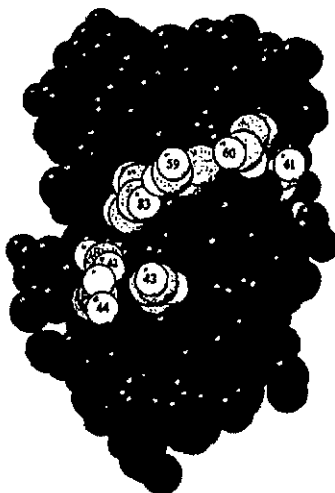


Fig. 11: Modèle plein de la poche hydrophile de la Pc de peuplier.

La poche hydrophile est localisée sur le côté "est" de la molécule (Fig. 11) et borde le résidu conservé Tyr 83 [9,12], ce qui l'implique dans un des deux chemins du TE [33,42,43]. Elle est composée de deux séries de résidus conservés: Asp 42, Asp 43, Glu 44 et soit Asp soit Glu en position 59, 60 et 61. Des différences apparaissent avec les plastocyanines de cyanobactéries et deux plastocyanines eucaryotiques (persil et orge). Elles ne présentent pas de résidus chargés aux positions de la poche hydrophile des plastocyanines eucaryotes [13]. Cependant Tyr 83 est conservé, ce qui indique que le TE a bien lieu par cette poche mais sans réaction de reconnaissance du partenaire dirigée par des charges négatives. Parmi les protéines cuivre bleu, seule l'amicyanine semble avoir une telle poche négative [44]

La poche hydrophobe est localisée au "nord" de la molécule et borde His 87, le seul ligand du cuivre exposé au solvant et le site le plus probable du TE (Fig. 12). Elle est composée d'au moins huit résidus conservés dans les plastocyanines eucaryotiques: Leu 12, Ala 33, Gly 34, Phe 35, Pro 86, Gly 89 et Ala 90 (passés en revue par Sykes, 1991 [12]). Il n'y a pas d'acides aminés chargés ou polaires dans cette région de la protéine.

Des différences apparaissent avec les plastocyanines des cyanobactéries, où le résidu 33 est une Lys et dans une des séquences, le résidu 35 est polaire. La nature de la poche hydrophobe est donc différente chez les cyanobactéries. Toutes les protéines cuivre bleu connues contiennent une poche hydrophobe, bordant l'His ligand du cuivre exposé au solvant [45].



Fig. 12: Modèle plein de la poche hydrophobe de le Pc de peuplier.

Les interactions avec le Cyt *f* et le P700:

Bien que la poche hydrophile soit impliquée dans les interactions avec les deux partenaires Cyt *f* et P700, la preuve de l'interaction du Cyt *f* dans le voisinage de Tyr 83 est la plus forte. En effet, Beoku-Betts et al (1985) [46] montre que des composés inorganiques chargés positivement, spécifiques pour le TE en Tyr 83, sont des inhibiteurs

spécifiques de l'oxydation du Cyt *f* par la Pc, ce qui confirme la liaison du Cyt *f* dans le poche négative près de Tyr 83 et suggère un site chargé positivement sur le Cyt *f*.

Sur la base d'études de modifications chimiques par l'éthylènediamine des groupes carboxyl de la poche négative, Anderson et al (1987) [47] suggère que la poche négative (incluant les résidus 42-45 et 59-61) de la Pc d'épinard est impliquée dans l'interaction avec le Cyt *f*. Les modifications aux positions 42-45 n'ont pas d'effets sur la réduction du P700 mais, de manière intéressante, les modifications de résidus 59-61 stimulent cette réaction. En relation avec ces résultats, Redinbo et al (1993) [45] suggèrent une association du Cyt *f* via les résidus 42-45 et 59-61 de la poche négative et une association du PS I via une interaction avec les résidus 59-61. Cette dernière interaction n'est pas incompatible avec un TE via His 87 pour la réduction du P700. En effet, Nordling et al (1991) [48] ont trouvé que le mutant Pc Leu12Glu montra une affinité très réduite pour les particules du PS I et un TE réduit vers le P700⁺. Ce travail est la meilleure preuve de la réactivité du PS I avec la Pc au niveau de la poche hydrophobe. De plus l'étude du mutant Tyr83His par Sigfridsson conclua à ce que Tyr83 ne prend pas part au TE vers le P700 [49].

1.3.1.3.2. Réactivité avec de petites molécules inorganiques

C'est avec des complexes métalliques qu'il a été possible d'établir la présence de deux sites de transfert d'électron dans la plastocyanine. Ces études ont été rassemblées par A.G. Sykas, dans deux revues, en 1985 [11] et en 1991 [12].

Les détails de ces études sont repris dans la thèse de Varardo. Rappelons tout de même que les deux couples rédox les plus utilisés dans les premières investigations sont $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+/4-}$ (410 mV) et $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ (370 mV) (phen = 1,10 phénantroline). La constante de vitesse observée en fonction de la concentration du complexe cationique montre un phénomène de saturation, s'expliquant par une association préalable du complexe avec la protéine. Ce n'est pas le cas avec le complexe anionique. Deux autres études corroborent ce résultat. D'une part, cette association augmente, lorsque la force ionique diminue, et disparaît dans NaCl 0,5M et d'autre part un pH acide bloque l'accès par protonation pour le complexe cationique sans influencer directement la réactivité avec le complexe anionique. L'utilisation d'un complexe cationique rédox inactif de chrome(III) influence négativement la vitesse du TE avec $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ sans perturber celui avec

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Ce qui confirme encore l'existence de deux sites. Des spectres RMN ont localisé les complexes rédox inactifs de chrome(III) à des endroits différents selon si ils sont cationiques ou anioniques. La localisation de ces sites par RMN n'est pas précise. Le complexe de Cr^{III} cationique se localise aux environs de la poche hydrophile et le complexe de Cr^{III} anionique aux environs d'His 87 dans la poche hydrophobe.

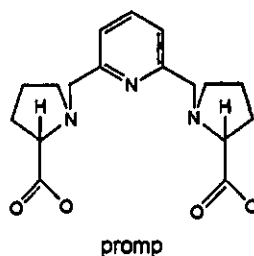
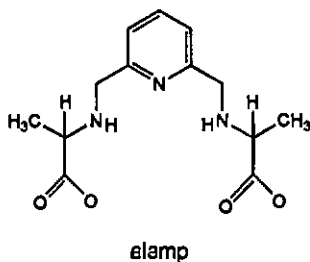
Une localisation précise du site cationique a été établie par séquençage de la plastocyanine après réduction par un équocomplexe de Cr^{III} . Ce sont les résidus 42 à 45. Les travaux de Verardo ont prouvé que l'His 87 est impliqué dans le TE avec les complexes Co^{II} (elamp), par des mesures CD suite au TE.

1.3.2. Complexes utilisés

D'après la thèse de Sauvain [50] et celle de Verardo [5].

Les ligands utilisés dans ce travail dérivent tous du N,N'-[(pyridine-2,6-diyl) bis (méthylène)] bis [amino acid]. Leurs structures, ainsi que celles des complexes qu'ils forment avec le cobalt(II), sont indiquées dans la figure 13.

e)



b)

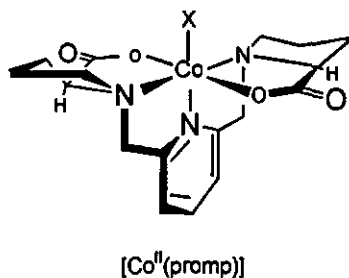
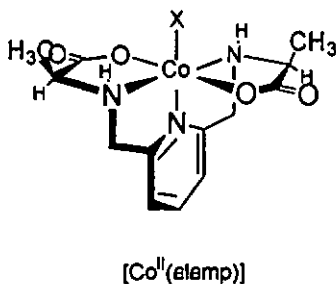


Fig. 13: a) Structure des ligands elamp et promp et b) structure spatiale des complexes utilisés dans ce travail.

Pour établir les relations existant entre la réactivité et la structure d'un réactif, il faut que ce dernier ait une structure unique et connue. Or les ligands pentadentés utilisés sont diastéréosélectifs, c'est-à-dire qu'ils possèdent une symétrie C_2 avec un cycle pyridine central, qui favorise un arrangement fpf (facial-périphérique-facial) pour les trois paires de cycles condensés (Fig. 14).

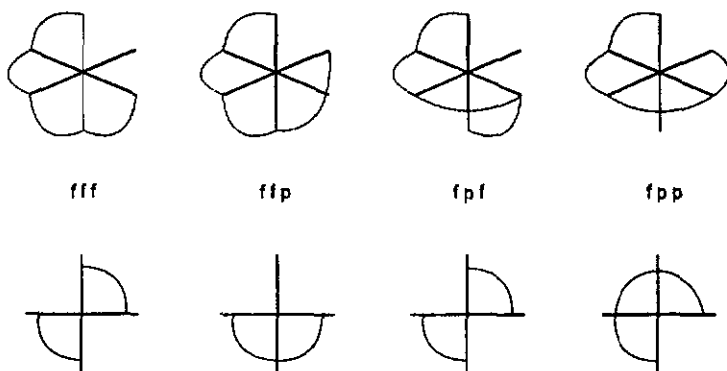


Fig. 14: Schéma indiquant les quatre possibilités de coordination d'un ligand pentadenté autour d'un centre métallique.

Cette diastéréosélectivité est très importante, car elle permet d'attribuer une configuration absolue à partir de la chiralité du ligand. Ainsi les structures, déterminées par Pousez [51] et Sauvain montrent que le résidu porté par le carbone α de l'unité aminocarboxyle est toujours orienté en position exo, c'est-à-dire en direction de la sixième position de coordination.

La fixation de la configuration de base ainsi que celle de la position des substituents permet d'admettre que l'utilisation d'un ligand optiquement actif conduit à un seul diastéréoisomère des complexes métalliques, et ceci aussi bien pour les complexes inertes du cobalt(III) que pour les complexes labiles de fer(II) et de cobalt(II). Avec les ligands utilisés dans ce travail, ce diastéréoisomère possèdera la configuration Δ pour les ligands de structure (R,R) et la configuration Λ pour les ligands de structure (S,S).

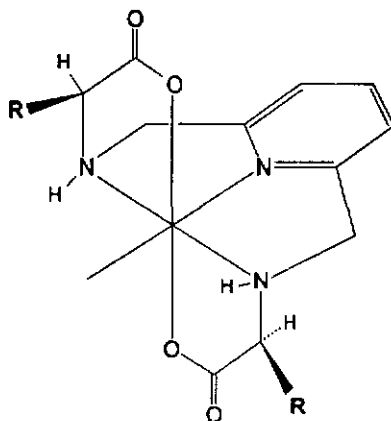


Fig. 15: Structure de la forme exo, indiquant que les restes R sont toujours dirigés du côté de la sixième position libre.

Comme l'a montré Seuvin, la taille du résidu R - par son encombrement autour de la sixième position libre (Fig. 15) - fait varier la distance sur laquelle l'électron est échangé. Plus les restes sont volumineux, plus la séparation entre les deux centres métalliques augmente et plus la réaction se ralentit. Or les modifications par génie génétique de l'encombrement aux alentours du site du transfert d'électron (His87) et plus particulièrement de la position Leucine 12 permettront une approche combinée de ces résultats.

On trouvera plus d'informations sur la synthèse, la structure, la formation et les propriétés rédox de ces ligands ou complexes dans la thèse de Sauvain [50] et celle de Verardo [5].

1.4. L'ADN recombinant et le génie génétique des protéines

Au début des années 60, le premier pas décisif dans le domaine de la biologie moléculaire est fait avec la découverte de l'importance de l'ADN comme support de l'information génétique. Apparaissent alors de nouvelles opportunités d'essayer de comprendre la vie. Les premières recherches s'occupent de systèmes simples comme les bactéries ou les virus. Il faudra attendre les années 70 et les techniques de recombinaison de l'ADN pour approcher des domaines plus complexes, les cellules de plantes ou d'animaux. De telles techniques permettent de travailler sur l'ADN, de l'extraire de la cellule, de le modifier et de l'y replacer.

Si l'on peut techniquement modifier un gène, on peut par conséquent modifier son "produit" : les protéines. Ce qui est un avantage certain pour la compréhension des fonctions de ces polymères impliqués dans de multiples fonctions des cellules: catalyse, régulation, structure, mobilité, etc ...

Pour obtenir une protéine mutée, il est premièrement nécessaire d'isoler le gène qui le code. Il existe pour cela plusieurs méthodes (purification de la banque cDNA contenue dans un virus; PCR) mais pour les gènes courts et de séquence connue, la méthode de choix est la synthèse in vitro.

Deuxièmement, il faut créer le mutation. Les méthodes actuelles sont relativement simples et deviennent de plus en plus efficaces.

Troisièmement il faut choisir un système d'expression convenable pour la protéine désirée. Parmi les différentes possibilités, le système faisant intervenir *E. coli* est le plus commun et souvent le premier envisagé. Il est souvent efficace, si la protéine à produire ne nécessite pas de modifications post-traductionnelles, comme l'ajout d'un sucre ou d'un lipide, au quel cas il faudrait faire appel à un système d'expression plus complexe: des cellules eucaryotiques.

1.4.1 Biologie moléculaire de la plastocyanine:

La gène da la plestocyanine de l'épinard est un gèna nucléaire ininterrompu, c'est-à-dire sens intron [52] (un intron ast une portion d'ADN insérée dans un gène et qui na participe pas à ca gène, ni comme partie codante ni comme zone de régulation.)

Le fait qu'une protéine chloroplastique soit codée par la noyau, paraît surprenant lorsque l'on sait que la chloroplasta possède sa propre information génétique (la chromosome chloroplastique - circulaire comme celui des bactéries III) et son propre système de production de protéine (ribosome de type bactérien III), réminiscences de son origine procaryotique. En effet de nombreuses indications en plus des deux citées, montrent une origine de procaryote symbiotique pour le chloroplasta et la mitochondria (organite de la respiration). Mais au cours de l'évolution la symbiote est devenu organite cellulaire et quelques-uns de ses gènes ont migrés dans le noyau de la cellule hôte. On ne s'étonne donc plus des ressemblances du gène de la plastocyanine avec certains gènes bactériens surtout en ce qui concerne la peptide signal [53], qui est utilisable pour la production de la plastocyanine dans *E. coli* [54]. La peptide est alors correctement reconnu et coupé par une protéase lors du passage de la membrane bactérienne par la plastocyanine, des similitudes existent en effet entre les machineries de transport des thylacoïdes et des bactéries [55]. La plastocyanine est donc codée dans le noyau et traduite dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur, la pré-plastocyanine, contenant un peptide signal. En effet, la plastocyanine fonctionnelle étant localisée dans le lumen du chloroplasta, elle doit s'y rendre depuis le cytoplasme. A l'aide de la partie N-terminale du peptide signal, elle franchit l'enveloppe du chloroplasta. Arrivé dans le stroma, cette partie est coupée par une protéase. Puis le partie C-terminel fait passer la plastocyanine à travers la membrane du thylacoïde. Arrivé dans le lumen, elle est coupée (Fig. 16).

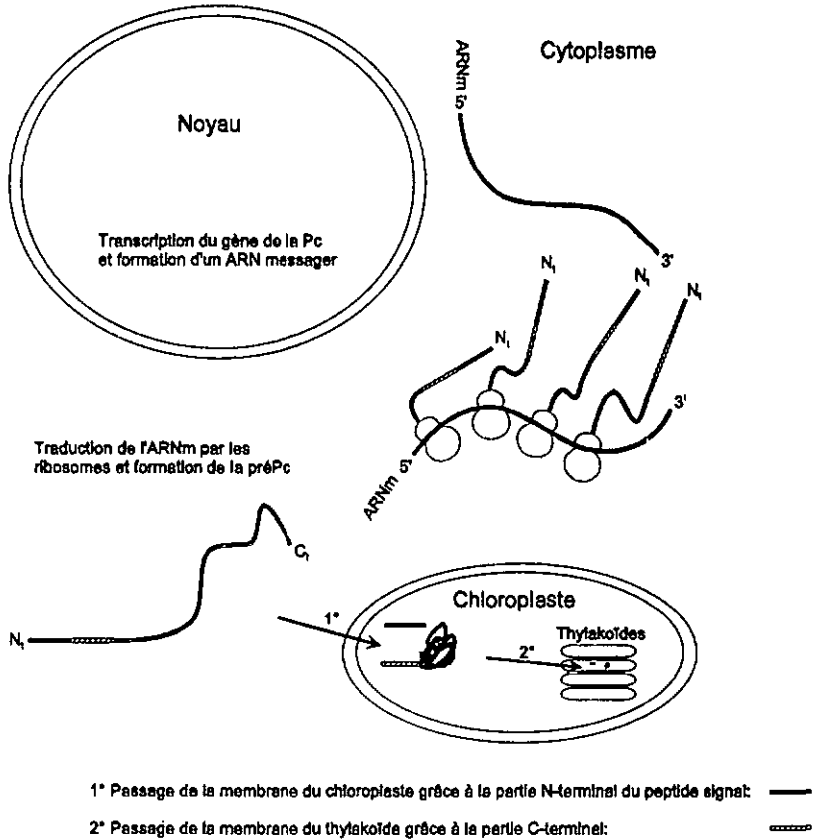


Fig. 16: Schéma de production de la plastocyanine dans l'épinard.

Le gène complet de la plastocyanine compte 1000 nucléotides [52] (Fig. 17). Tous ne sont pas transcrits en un ARN messager; lui-même n'est pas traduit dans son ensemble. Les nucléotides 1 à 184 contiennent les éléments de régulation de la transcription. Les n°185 à 844 constituent l'ARNm primaire - le plus fréquemment produit - (de 185 à 918 l'ARNm alternatif): de 248 à 250 : RBS (site d'attachement de ribosome)
 de 251 à 754 : la pré-Pc (acides aminés: -69 à 99)
 de 251 à 457 : le peptide signal (acides aminés: -69 à -1)
 de 458 à 754 : la Pc mature (acides aminés: 1 à 99)
 de 755 à 844/918 sur les ARNm et jusqu'à 1000 sur l'ADN : différents éléments de terminaison de la transcription.

1	GAGCACAACC AATGAAAAAC TAGATAATAC CCTTTATTGG CCCACACATC
51	ACAAATCCTT TAATCCAATG CCACTAAAAA TCCCACAAAT GAAAACCACA
101	CAAAACCATG TAAACAGACA TCACCTCATC TATCCTCCAT TTTATCACCT
151	CTTATTAAAT CCCATCCTCG CTCTCAGCAC TCTTTGGCAA TTGTCAATTC
201	TTAATTGCAT TCCACTTAAA CCCCTCCAAA ATCCTCCTCC TTCCATTACA
251	ATGGCCACCG TCGCTTCCTC CGCTGCCGTA GCGTCCCCCT CCTTTACCGG
301	CCTTAAGGCC TCAGGATCCA TCAAGCCTAC CACCGCAAAA ATCATCCCAA
351	CCACCACCGC CGTCCCAAGA TTGTCTGTCA AGGCTTCCTT GAAGAATGTC
401	GGAGCCGCGG TGGTAGCAAC CGCAGCCGCC GGACTTCTAG CCGGAAACGC
451	CATGCCCGTT GAGGTGTTGC TCGGAGGGGG TGACGGATCA TTGGCATTCC
501	TTCCAGGAGA CTTCAGCGTA GCCTCGGGCG AGGAGATCGT ATTCAAGAAC
551	AATGCCGGAT TCCCCACAA CGTAGTGTTC GACGAGGAG AGATTCCCTC
601	CGGTGTGCAC GCCCGAAGA TTTCGATGTC CGAGGAGGAT TTGCTGAATG
651	CACCAGGGGA AACTTACAAA GTTACCCTTA CTGAOAAAGG AACTTACAAG
701	TTCTACTGCT CACCCACCA GGTGCTGGT ATGGTGGGAA AAOTAACGT
751	CAACTAATAT TTTAATGAAA AATTGAATTT TTATTTATAT GACTTTGTTG
801	TAGAGCTATT TATATAAAG ATCTCATCAA TTGGTACGTT TAGCACATTT
851	GTGTAGAGCT ATTTATTCGA AATTTGGTTT AGATTTGATC TCATAAATCA
901	TAATCCAAAA TTGGATTATA CCGGTTTAGA TTGAATTGA ACTACAGTAC
951	TACACTCCTA AGATAAAATG CCACCATTCA ATCTTTATCT GAAAGAATTC

Fig. 17: Séquence complète du gène de la Plastocyanine.

1.5 L'azurine: structure, fonction et génétique:

De nombreuses études ont été menées sur l'azurine, protéine cuivre bleu bactérienne de 14 kDalton. On connaît actuellement les séquences en acides aminés de dix azurines différentes avec 47 résidus conservés sur 129. Mais seulement 9 résidus sont invariables. Parmi eux se trouvent les ligands du site actif: His46, Cys112, His117 et Met121 leurs distances au Cu sont semblables à celles de la plastocyanine. La structure cristalline de l'azurine a été déterminée pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Alcaligenes danitrificans* références citées en [11]. Ses huit feuillets- β forment une structure en baril, avec une topologie semblable à celle de la plastocyanine. Mais l'azurine n'est pas de région fortement chargée, la plupart des résidus chargés étant neutralisés par un résidu voisin de charge opposée. Son pI, égale à 5,6, est compatible avec la faible charge négative à pH ~ 7 . Une poche hydrophobe est aussi présente dans l'azurine, elle borde l'His117, seul ligand du cuivre exposé au solvant, c'est le meilleur site pour le transfert d'électrons. Le cuivre y est un peu plus enfoncé ($\sim 7\text{\AA}$) que dans la plastocyanine ($\sim 6\text{\AA}$).

L'azurine semble impliquée, comme transporteur d'électron ($E_0' = 280-339\text{ mV}$), dans la dénitrification ou respiration nitrate. Ce processus est le fait de certaines bactéries, qui "respirent" sans oxygène, l'accepteur final des électrons n'étant pas l'oxygène mais le nitrate (Fig. 18).

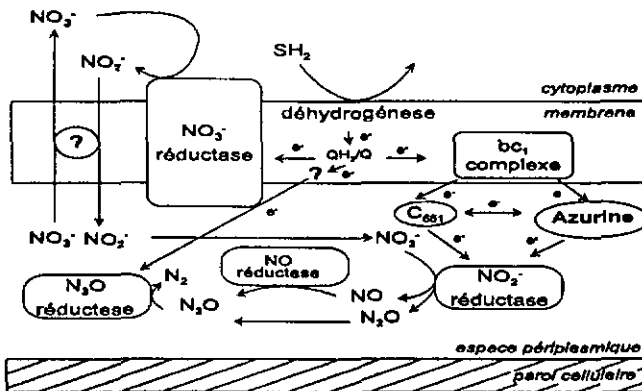


Fig. 18: Organisation hypothétique des enzymes de la respiration nitrate de *Ps. aeruginosa* et rôle de l'azurine.

Le gène de l'azurine de *Ps. aeruginosa* a été caractérisé par Lundberg puis complété par Nordling [56]. A peine plus grand que celui de la plastocyanine (1284 nucléotides), il contient en plus de différents éléments de régulation, la partie codant pour l'azurine avec un peptide signal (Fig. 20). Ce peptide signet emmène la protéine du cytoplasme, où elle est produite, jusque dans l'espace péripasmiq, où elle fonctionne (Fig. 19).

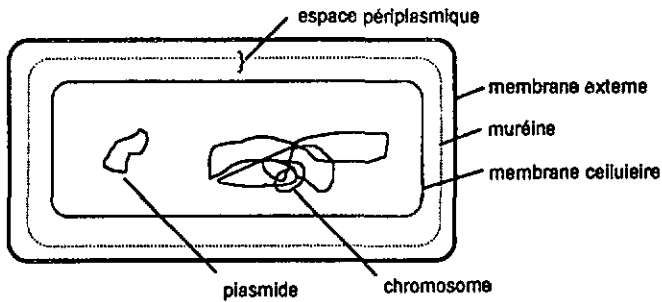


Fig. 19: Représentation schématique des compartiments d'une bactérie Gram négative.

1	CTGCAGGCTC	TGCGGGATGA	TCCCGATCAC	TTCCGCGCCG	CGGCCAATGC
51	GGCGTCCGCC	ACGGTGCCCA	TCAGACCGAC	CGCGCGCCCA	CCGTAGACCA
101	GGGTCAGGCC	GCCTCGGCC	AGGTGCCGGC	CGAGGGCCAC	GGCGGCTTCC
151	TGGTAGACCG	GGGAAGCGCC	GGGGCTGGCG	CCACAGAATA	CGCAGACGGA
201	ACGCAAGTTC	ATGATCGACT	CCTGTGCGGG	GTGGAAAAAG	CGGCACAGGG
251	TAGCGGCTGG	GAGCGCTTCG	ACCAAGCCGT	GCGAAGCATT	GCCGGACGTT
301	GCGTCGCAGG	CGCGAAGCGG	CACATCTGTG	CTAAAACAGG	AGTTCCCCGT
351	AGTAAACGCC	GGGCAGATCC	CGCTCGATGC	CCCGCCACGT	CCGGTTCGGG
401	TTTGACCTGA	ATCAGTGGAA	CTCGGTGCCC	GATCGGGCAG	TCTGCTCTTT
451	CAGGATTCAT	CGCCCAACCT	GCCTAGGAGG	CTGCTCCATG	CTACGTA AAC
501	TCGCTGCGGT	ATCCCTGCTG	TCCTGTCTCA	GTGCGCCGCT	GCTGGCTGCC
551	GAGTGCTCGG	TGGACATCCA	GGGTAACGAC	CAGATGCAGT	TCAACACCAA
601	TGCCATCACC	GTCGACAAGA	GCTGCAAGCA	GTTCACCGTC	AACCTGTCCC
651	ACCCCGGCAA	CCTGCCGAAG	AACGTTCATG	GCCACAACCTG	GGTACTGAGC
701	ACCCCGCCCG	ACATGCAGGG	CGTGGTCACC	GACGGCATGG	CTTCCGGCCT
751	GGACAAGGAT	TACCTGAAGC	CCGACGACAG	CCGCGTCATC	GCCACACCAA
801	AGCTGATCGG	CTCGGGCGAG	AAGGACTCGG	TGACCTTCGA	CGTCTCCAAG
851	CTGAAGGAAG	GCGAGCAGTA	CATGTTCTTC	TGCACCTTCC	CGGGCCACTC
901	CGCGCTGATG	AAGGGCACCC	TGACCCTGAA	GTGATGCGCG	ACGATCCGCT
951	GCATGAAAAA	GCCCGGCCCG	TGCCGGGCTT	TTCATGGGG	GCGCGCCGGG
1001	CTCAGCGCGT	AGCGTGCCGC	CATCGCCTCG	CCGGCCAGTT	GGTGCACGGG
1051	CCGGGTCGGA	TGCCACTCGT	CCCAGAAGTA	GTACTGGTCC	GGGTTGGCGC
1101	AGGCCGGGCG	GACGCTGGGC	TGGGTGCGCT	GGCAGGGCGC	GTCCAGCTCC
1151	ACCAGGCCAT	AGCGCGCCGG	GTGCGCCCGC	AAGTGGCGGC	TGAAGGTGAG
1201	ATGGTCGAAC	CAGCTCAGCT	CCAGGCCGCG	GCTCTTGGCG	AGGGCGGCGA
1251	GCTGGATCGG	CAGGCTGGCG	TTGACTGCCT	GCAG	

Fig. 20: Séquence complète du gène de l'azurine:

nucléotides: 488 à 547 : peptide de transit (acides aminés -19 to -1)

548 à 931 : azurine mature (acides aminés 1 - 128)

2 Techniques d'ADN recombinant et génie des protéines

2.1. Généralités

Lorsque l'on veut produire une protéine de séquence connue, on a besoin tout d'abord d'une source de son gène et de l'isoler de cette source, puis de l'introduire dans un système d'expression, ce système dans une bactérie et finalement de purifier la protéine produite.

2.1.1 Librairies génomiques

Une librairie génomique est une collection de gènes en nombre suffisant pour contenir une copie de chacun d'eux. Elle est établie en digérant l'ADN total des cellules par un enzyme de restriction, les fragments ainsi obtenus sont clonés dans un vecteur adapté. En ce qui concerne les plantes une librairie complète contient un si grand nombre de gènes différents qu'il faut souvent considérer une autre librairie plus ciblée, par exemple sur le degré d'expression des gènes dans telle ou telle partie de l'organisme. C'est la quantité d'ARN messager (ARNm) qui reflète le degré d'expression du gène.

La méthode consiste à convertir l'ARNm en un ADN complémentaire (ADNc) par l'enzyme transcriptase inverse, d'origine virale, et de le cloner dans un vecteur. Une telle librairie construite à partir de l'ADNc représente l'ARNm présent dans la préparation de départ. Outre le fait de restreindre le nombre des gènes à ceux exprimés, l'avantage de l'utilisation de l'ADNc pour le clonage est que l'information génétique est continue, les introns étant excisés au niveau de l'ARNm.

Pour ce qui est des bactéries, leur génome est beaucoup plus petit, il n'est pas nécessaire de réduire le nombre des gènes inintéressants. De plus leur information génétique ne contient pas d'introns, elle est continue. L'ADN total constitue pour les techniques de PCR une librairie suffisante, sans qu'il soit utile de le digérer et de le cloner.

Certains gènes eucaryotiques n'ont pas d'introns, par exemple le gène de la plastocyanine d'épinard. Dans ce cas, l'ADN total des feuilles d'épinard, constitue une librairie adéquate, comme pour les bactéries.

2.1.2 Une méthode de choix pour l'isolement de gènes: la PCR

Récemment mise au point, la PCR (Polymérase Chain Reaction) consiste en la polymérisation *in vitro* de l'ADN à partir d'une amorce (primer) par une ADN polymérase bactérienne en fonction d'un simple brin matrice. Son principe est simple, il découle de la duplication de l'ADN *in vivo*. Alors que dans une cellule toute une batterie de protéines est impliquée dans le déroulement, la séparation et le maintien séparé de la double hélice d'ADN, *in vitro* c'est la seule élévation de température qui assure à l'ADN polymérase l'accessibilité au simple brin matrice. Ce qui nécessite l'utilisation d'une enzyme thermostable, on en trouve dans des bactéries thermophiles comme *Thermus aquaticus*, d'où le nom de Taq donné à un des enzymes commercialisés. De plus la possibilité de synthétiser des amorces de séquence choisie permet en fonction de l'hybridation G/C et A/T des nucléotides et du T_m (température critique d'hybridation ADN/ADN pour une séquence donnée) de localiser une région précise parmi un très grand nombre de nucléotides.

Démarche (Fig. 21):

La séquence intéressante est bornée par deux primers complémentaires à chacun des deux brins et orientés l'un contre l'autre. Après dénaturation thermique de l'ADN template (dénaturation), les primers peuvent s'hybrider à l'ADN simple brin (hybridation) et sont ensuite allongés en présence de nucléotides triphosphate et de la Taq polymérase (élongation). La répétition du cycle: dénaturation, hybridation et élongation conduit à une amplification de la séquence désirée.

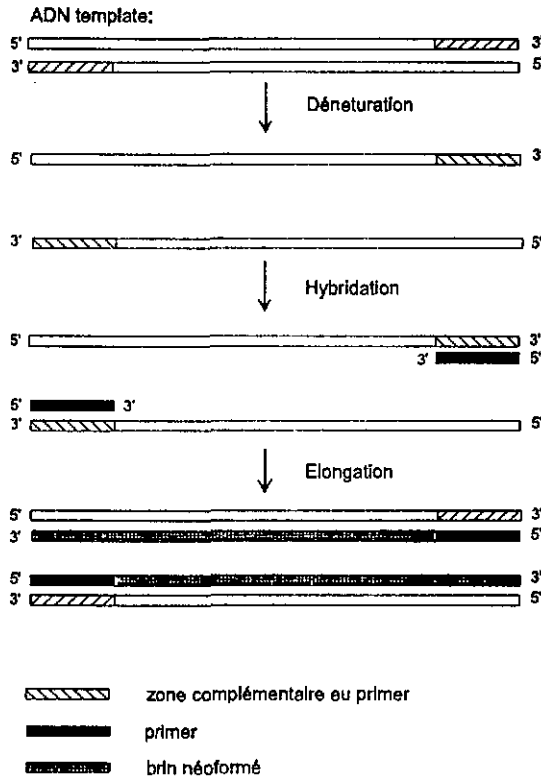


Fig. 21: Schéma de déroulement du premier cycle de la PCR.

2.1.3 Expression dans *E. coli*

2.1.3.1. Vecteurs

Un très grand nombre de vecteurs ont été développés pour le surexpression de protéines dans *E. coli*. Tous contiennent certains éléments de base:

1. Le plasmide utilisé comme vecteur d'expression doit être présent dans la cellule en un très grand nombre de copies (50 - 100).
2. Une origine de répllication doit être présente.

3. Le vecteur doit contenir un marqueur de sélection (gène de résistance à un antibiotique), pour prévenir la présence dans la culture de cellules sans plasmide.
4. L'expression du gène doit être contrôlée par un promoteur fort.
5. Une séquence complémentaire à la sous-unité 16S du ribosome [la séquence Shine-Dalgarno (SD)], site de liaison du ribosome.
6. Un codon d'initiation, préférablement AUG. La distance entre SD et AUG peut être optimisée.
7. Le codon stop du gène doit être suivi par une séquence de terminaison de la transcription.

2.1.3.2. Promoteurs

Le promoteur est la région spécifique de l'ADN où se lie l'ARN polymérase, enzyme principale de la transcription. Cette séquence d'ADN est reconnaissable par deux régions consensus: les régions -10 et -35. La puissance d'un promoteur est définie par l'efficacité avec laquelle il lie l'ARN polymérase et conduit à une bonne transcription du gène.

Pour contrôler la transcription, un promoteur inductible est nécessaire, spécialement lorsque le produit du gène est toxique pour la cellule. Les promoteurs inductibles les plus répandus sont les promoteurs *lac*, *lacUV5*, *trp* et l_{pL} . Des promoteurs plus puissants en sont dérivés: *trc* et *tac*, ce sont des promoteurs hybrides entre *lac* et *trp*, ce qui change c'est la distance entre les deux régions consensus, pour une optimisation du système [57].

Si ces promoteurs sont largement utilisés, c'est dû en partie à ce qu'ils sont faciles à induire avec un inducteur artificiel l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), n'intervenant pas dans le catabolisme des cellules,.

En plus de ces promoteurs, de type bactérien, on a également recours au très puissant promoteur du bactériophage T7. Dans ce système le T7 ARN polymérase est codée sur un plasmide séparé ou sur le chromosome de la cellule hôte. Cette enzyme est très spécifique au promoteur T7 et ne se lie pas aux autres séquences. De plus, elle est cinq fois plus rapide que l'ARN polymérase de *E. coli*. [58]

2.1.3.3. Stabilité des ARN messagers

Les ARNm de bactérie ont une durée de vie très variable allant de 30 s à 20 min. Les variations dans la durée de vie des ARNm sont considérées comme des moyens de répondre aux changements de l'environnement du microorganisme. Il est certain qu'une telle différence de durée de vie affecte la quantité de protéine produite. Ce sont des endo- et exo-ribonucléases qui dégradent l'ARNm, or certains ARNm montrent des stabilités différentes suivant si la vitesse de croissance des bactéries est forte ou faible, suivant la source de carbone ou d'azote. Il y a donc toute une série de paramètres à considérer lors de la surexpression de protéines.

2.1.3.4. Usage des codons

Pour un même acide aminé il existe parfois plusieurs codons et bien que tous soient reconnus par l'ensemble des êtres vivants, certains ont établi des préférences pour le codon X plutôt que le Y [59]. Ces préférences se traduisent par une population d'ARNt-X plus grande que celle de l'ARNt-Y (ARNt = ARN de transfert), ainsi la traduction de 10 codons X est plus rapide que celle de 10 codons Y. Il serait donc important de considérer la composition en codon du gène que l'on veut exprimer dans *E. coli*, si celui-ci est issu d'un autre organisme.

2.1.3.5. Protéolyse

L'introduction de protéines étrangères dans *E. coli* ne passe pas toujours inaperçue pour la cellule. On peut alors détecter une quantité raisonnable d'ARNm, avoir une situation favorable à la traduction et un bon choix de codon sans pour autant constater l'accumulation de la protéine. En effet, des protéases peuvent attaquer la protéine dès sa formation. Bien qu'il y ait des protéases dans tous les compartiments de la cellule, leur spécificité diffère, ainsi une protéine dégradée dans le cytoplasme peut être stable dans l'espace périplesmique. La sécrétion dans le milieu de culture, la formation de corps d'inclusion, l'ajout de peptide en C- ou N-terminal ou l'utilisation de souches d'*E. coli* déficientes en certaines protéases peuvent aider à contourner le problème de la protéolyse.

Remarquons tout de même que pour séparer un peptide signal d'une protéine mature on compte sur une activité protéolytique dans la membrane d'*E. coli*.

2.1.4. Purification des protéines

Le chemin de purification dépend des propriétés de la protéine visée (thermostabilité, solubilité, taille, charge en fonction du pH, hydrophobicité...). De nombreuses techniques sont à notre disposition. Généralement on procède tout d'abord à des fractionnements grossiers, comme la dénaturation thermique des contaminants ou la précipitation au sulfate d'ammonium, puis à différentes techniques chromatographiques.

2.2 Méthodes générales de génie génétique

2.2.1 Préambule

Le plus grande partie des méthodes utilisées dans ce travail sont tirées du recueil de protocoles de Sambrook, Fritsch et Maniatis (1989) [60], avec quelques modifications mineures. Les autres références seront citées au fur et à mesure de leur description.

2.2.2 Souches et vecteurs

Pour les séquençages, sous-clonages, mutagénèses et expressions des protéines, j'ai utilisé le même vecteur: le système d'expression pTrc 99A (Pharmacia) (carte cf. Fig. 22), répliqué par les bactéries *E. coli* JM 105 (génotype: *thi*, *rpsL*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, *supE*, $\Delta(\text{lac-proAB})/F'$ [*traD36*, *proAB*⁺, *LacI*^q *LacZ* Δ M15] en présence de 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampiciline. On peut trouver la séquence complète de ce vecteur dans [61].

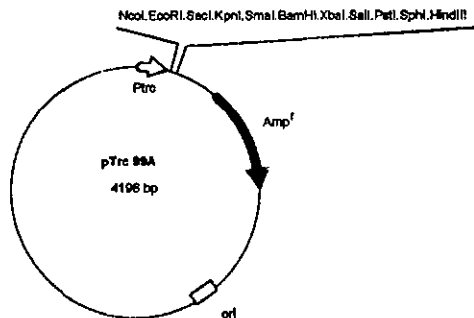


Fig. 22: Carte génétique simplifiée du vecteur pTrc 99A.

Deux autres systèmes d'expression ont été testés pour la production de la plastocyanine: Le vecteur pET 3d et la cellule *E. coli* BL21(DE3) [58], un don de J.-P. Jacquot, Orsay France.

Le vecteur pKK 233-MTTL, fourni par I. Kopetzky, Boeringer Penzberg, et la cellule *E. coli* BN 103, un don de N. Müller de l'université de Berne.

2.2.3 Amorces (primers) utilisées dans ce travail

L'ensemble des amorces utilisées dans ce travail sont commandées chez Microsynth (Balgach, Suisse). Le tableau 1 de la page suivante les reprend toutes.

2.2.4 Sources d'ADN matrice (DNA template) utilisées dans ce travail

a) ADNc d'épinard: Young spinach leaves polyA purified cDNA expression libraries in Unizep Stratagene, don de W. Gruissem, département de biologie végétale, université de Californie, Berkeley.

b) ADN total d'épinard, extrait de jeunes feuilles selon [60].

c) ADN chromosomique de *Pseudomonas aeruginosa*, extrait selon [62]

2.2.5 Source des anticorps α -plastocyanine

Les anticorps utilisés pour la détection de la plastocyanine, contenus dans un sérum de lapin ont été généreusement fournis par R. Malkin, département de biologie végétale, université de Californie, Berkeley.

Utilisation:	Séquence:	Norm:
1) Pour le séquençage et l'amplification à partir des vecteurs: vecteur pTrc 99A	5'-TTGACAATTAATCATCCGGC-3' 5'-GTGTTCTGATTAATCTGTATCAGGC-3' 5'-TTAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-CGATCAATAACGAGTCGCC-3'	: pTrc-1 : pTrc-2 : T7 promoteur : T7 terminateur
2) Pour l'amplification de la plastocyanine (Pc): en N-terminal: en C-terminal:	5'-AACGCCATGGCCGTGAGGTG-3' 5'-CCGTGGATCCGCTCTACAACAAAAGTC-3'	: pc-1 : pc-2
Pour l'amplification de l'azurine (Az): en N-terminal: en C-terminal:	5'-GGAGGCTGCTCCATGGTACG-3' 5'-CCGTGGATCCCTCACTTCAGGGTCAGGG-3'	: az-1 : az-2
3) Pour la construction de la chimère: en N-1 de la Pc / C-1 de l'Az:	5'-CCCTCCGAGCAACACCTCAAC / GCCCAGCAGCGGGCCTGAG-3'	: azpc-1
4) Pour la mutagenèse dirigée: Pc G68E Pc L12G: Pc L12A: Pc L12V: Pc L12F:	5'-GGGTAACTTGTAAATTTCCCCTGG-3' 5'-CCTGGAAGGAATGCCCTGATCCGTC-3' 5'-CCTGGAAGGAATGCCCTGATCCGTC-3' 5'-CCTGGAAGGAATGCCACTGATCCGTC-3' 5'-CCTGGAAGGAATGCANAATGATCCGTC-3'	: e68 : l12g : l12a : l12v : l12f

Tableau 1: liste des primers utilisés dans ce travail:

- 1) Primers propres aux vecteurs utilisés, bordant le polylinker.
- 2) Souligné une fois le site NcoI et souligné deux fois le site Bam HI.
- 3) Primer hybride, en italique la partie azurine.
- 4) Primers mutés, en gras le codon mutant.

2.2.6 Digestion, élution et sous-clonage de fragments d'ADN

2.2.6.1 Digestion de l'ADN

Pour l'utilisation des enzymes de restriction, j'ai respecté les indications des fournisseurs (New England Biolabs, Gibco-BRL, Stratagene, Boehringer Mannheim, Promega) quant au rapport quantité d'enzyme / quantité d'ADN, à la durée et à la température d'incubation ainsi qu'au choix du temps de réaction approprié.

2.2.6.2 Elution des fragments d'ADN

Selon la taille et la quantité du matériel à éluer, plusieurs procédés d'élution ont été employés:

- système d'électroélution de Schleicher et Schüll, spécialement pour l'élution de grande quantité d'ADN ou de petits fragments (<200 paires de bases (pb))
- système de résine d'adsorption des ADN « Elu-Quick™ » de Schleicher et Schüll pour des fragments de taille >200 pb, destinés à être sous-clonés ou pour la purification de plasmides digérés.
- système "maison" d'électroélution rapide pour les fragments de petite taille (<200 pb). Dans ce cas, l'ADN est séparé sur un gel d'agarose, après une bonne séparation, une poche est directement creusée devant la bande à éluer et remplie de tampon d'électrophorèse stérile (0,5x TBE: 45mM Tris-borate, 1mM EDTA, filtré à 0,22 µm) puis on laisse migrer l'ADN jusque dans la poche en suivant la migration avec une lampe UV. L'ADN en solution est, soit utilisé directement, soit précipité et récupéré dans de l'eau ou du TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA). Ce système est de ma préférence pour l'élution des mégaprimers.

2.2.6.3 Préparation des vecteurs pour le clonage ou le sous-clonage

L'utilisation de deux sites de restriction pour le clonage d'insert limite considérablement la proportion de vecteurs reliés.

Après digestion d'une bonne quantité (0,5 à 1 µg) de plasmide en deux aliquots, l'un avec le premier enzyme, l'autre avec le second, l'intégralité de la digestion est vérifiée sur gel d'agarose. Les deux aliquots sont extraits au chloroforme, précipités à l'éthanol et repris

dans l'eau. Le premier aliquot est alors digéré par la seconde enzyme et le deuxième par la première enzyme. Après incubation et analyse sur gel, les deux aliquots sont réunis et purifiés sur gel d'agarose. Cette démarche prévient les digestions incomplètes. Si une des digestions reste incomplète même après avoir augmenté la quantité d'enzyme ou la durée de l'incubation, la fraction digérée de l'aliquot est purifiée sur gel d'agarose avant l'étape suivante.

2.2.6.4 Préparation des fragments PCR pour le sous-clonage

Les fragments PCR sont purifiés sur gel avant d'être digérés. Les deux digestions sont réalisées successivement dans le même mélange avec un tampon commun aux deux enzymes. Le raccourcissement du fragment par digestion est confirmé sur gel d'agarose pour chacune des deux étapes.

2.2.6.5 Ligation et transformation

Le rapport molaire entre l'ADN du vecteur et de l'insert a toujours été de 1:3 à 1:6, lors des ligations. Deux méthodes ont été utilisées.

La première, classique, suit les instructions des fournisseurs relatives à l'ADN ligase du phage T4 (Gibco-BRL) et la durée de l'incubation varie de 12 à 24 heures à 14°C.

La deuxième procède par ultrason, le mélange réactionnel reste la même que pour la première, seule la manière d'incuber change: 15 minutes aux ultrasons à 14°-16°C [63].

Les transformations suivant le protocole établi par Hanahan [64], en ce qui concerne la transformation de bactéries par un produit de ligation.

Certaines modifications de la méthode ont été apportées pour la transformation de bactéries par une grande quantité d'un seul type de plasmide: ~10ng de plasmide sont ajoutés à 100-200µl de cellules compétentes tout fraîchement dégelées et directement plongées pour 2 minutes dans un bain-marie à 42°C suivi de 2 minutes à 4°C, dans de la glace et finalement le mélange est étalé sur boîte de Pétri. Cette méthode convient parfaitement pour la transformation des cellules avant une culture pour la production de protéine.

2.2.6.6 Isolément d'ADN de plasmides

Que se soit pour de petites ou de grandes quantités d'ADN les protocoles de lyse alcaline puis de purification décrit par Sambrook et al. [60], ont été suivis en omettant toutefois l'étape de purification au polyéthyléneglycol, car il peut provoquer des inhibitions éventuelles lors des digestions.

2.2.7 Polymérisation en chaîne (PCR)

Les ADN polymérases utilisées proviennent de différentes sources: Réplitherm, Taq (Stratagene), SuperTaq.

a) Utilisation avec des primers simple brin <30 nucléotides (pour l'amplification de fragments et la production de mégaprimers)

ADN matricia	10-50 ng
primer-1	2 μ M
primer-2	2 μ M
désoxynucléotides triphosphate	0,2 μ M
tempon de réaction	1x
Taq-polymérase	1 unité
volume final	100 μ l

Tampon de réaction 10x: 100mM Tris-HCl pH 9, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton-X 100, 0,1% gélatine.

Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 minutes, le programme suivant est lancé:

Dénaturation:	30 secondes à 94°C
Hybridation:	30 secondes à 50° - 65°C (selon le composition des primers)
Elongation:	60 secondes à 72°C
Nombre de cycles:	20 à 30

b) Utilisation avec un mégaprimier double brin 120 à 300 nucléotides et un primer simple brin < 30 nucléotides (pour l'assemblage de fragments et le mutagénèse dirigée). Pour chaque construction trois quantités élémentaires (5 à 50 ng/ μ l) de mégaprimier sont testées¹⁾

ADN matrice	10-50 ng
primar-1	2 μ M
mégaprimar	5, 10, 20 μ l ¹⁾
désoxynucléotides triphosphata	0,2 μ M
tampon	1x
Taq-polymérase	1 unité
H ₂ O milli-Q stérila ad	100 μ l

Après une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C pendant laquelle les deux brins de l'ADN matrice et du mégaprimar sont séparés, le programme suivant est lancé:

Dénaturation: 30 secondes à 94°C

Hybridation: 30 secondes à 50° - 65°C (selon la composition du primer)

Elongation: 60 secondes à 72°C

Nombre de cycles: 20 à 30

2.2.7.1 Marquage terminal d'oligonucléotides par la T4 polynucléotide kinase

Pour les réactions de séquençage, j'ai utilisé des primers marqués radioactivement par un échange isotopique du phosphata au 5' grâce à la polynucléotide kinase du phage T4. 10 pmoles de l'oligonucléotide sont incubées dans une solution 50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 100nM spermidine contenant 10 pmoles de [γ -³²P] ATP ou [γ -³³P] ATP (3000 Ci/mmol) et 5 unités de kinase pendant 30 minutes à 37°C. La kinase est ensuite inactivée à 95°C pendant 3 minutes et le primer est directement utilisable pour le séquençage.

2.2.7.2 Séquençage d'ADN double brin par PCR

Les séquences réalisées dans ce travail ont toutes été effectuées à l'aide du kit "fmol™ DNA Sequencing system" de Promega (1992) [65].

500ng à 1 μ g du plasmide sont dilués dans 16 μ l d'une solution 50mM Tris-HCl pH 9, 1mM MgCl₂ contenant 1.5 pmol de l'amorce de séquençage marquée au ³²P/³³P (2.2.7.1), 5 unités de Sequencing Grade Taq DNA polymerase (Promega) sont ajoutées puis 4 μ l

de ce mélange sont aliquotés en 4 tubes, contenant 2 μ l d'une solution de désoxynucléotides triphosphate et didésoxynucléotides triphosphate respectivement ddGTP, ddATP, ddTTP et ddCTP. Le programme PCR suivant a été utilisé, après une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C:

Dénaturation: 20 secondes à 94°C

Hybridation: 20 secondes à 45°C

Elongation: 40 secondes à 72°C

Nombre de cycles: 35

2-3 μ l des réactions sont finalement analysés sur gel polyacrylamide dénaturant de composition suivante:

urée	28,8 g
acrylamide (40%)	9 ml
TBE 10x (pH 8,7)	6 ml
Eau Mili-Q	20,5 ml

Après dissolution de l'urée dans un bain marie à ~40°C, ajouter 240 μ l d'une solution 10% APS (ammonium persulfate) et dégazer 3 minutes aux ultrasons. Juste avant de couler le gel ajouter 60 μ l de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine) ou [1,2-Bis(diméthylamino)éthène].

2.3. Stratégie générale:

L'expression de la plastocyanine a fait l'objet de nombreux travaux [13,54,66,68]. Ils montrent que la plastocyanine n'est pas exprimée, si la seule partie codante est utilisée. Isabelle Maillat, dans notre laboratoire, a elle aussi tenté l'expression de la plastocyanine en utilisant que la partie codante dans *E. coli*, sans succès.

Nordling a apporté une solution en 1990 [69]. Il faut créer une chimère en associant le peptide signal de l'azurine à la partie codante de la Pc. Elle a exprimé également l'azurine de cette manière [66].

2.3.1 Stratégie de clonage:

La séquence des gènes (plastocyanine et azurine) à amplifier étant connue, j'ai choisi la PCR pour leur isolement et leur amplification.

Les primers utilisés pour l'amplification des deux gènes: plastocyanine et azurine contiennent des sites de restrictions pour le sous-clonage dans les vecteurs et sont répertoriés dans le tableau 1.

Après amplification et digestion des deux gènes, ils sont ligués dans le vecteur pTrc 99A à partir des sites Nco I et Bam HI.

2.3.2 Construction de la chimère:

Basé sur les travaux de Orgel et Mc Pherson [70] et en utilisant un primer hybride "azpc-1", associant la séquence C-terminal du peptide signal de l'azurine à la séquence N-terminal de la plastocyanine (tableau 1), j'ai construit la chimère selon le modèle suivant: lors de la première PCR, les primers az-1 et azpc-1 servent à l'amplification d'un mégaprimier à partir de l'ADN total de *Ps. aeruginosa*. La séquence de ce mégaprimier est celle du peptide signal de l'azurine avec en 3' les premiers nucléotides de la plastocyanine. Lors de la deuxième PCR à partir d'une librairie d'ADNc d'épinard, les premiers nucléotides de la plastocyanine (la partie "pc") du mégaprimier s'hybrident au gène de la plastocyanine et la chimère est constituée (Fig. 23).

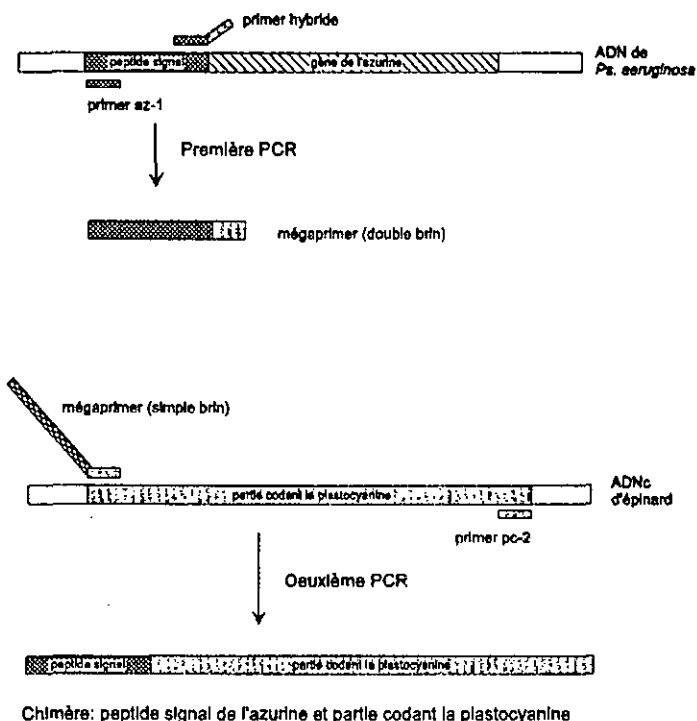


Fig. 23: Méthode de construction de la chimère AzPc.

2.3.3 Mutagenèse dirigée:

La méthode de mutagenèse dirigée que j'ai appliquée se base sur le PCR [71]. On procède en deux étapes, tout comme pour la construction de la chimère. La première étape consiste en une amplification partielle du gène, sous-cloné dans le vecteur pTrc 99A, avec un primer contenant la mutation désirée. On a alors la formation d'un mégaprimer, contenant la mutation mais seulement une partie du gène de la chimère. La deuxième PCR aboutit à l'amplification complète en utilisant le produit de la première comme primer, voir figure 24.

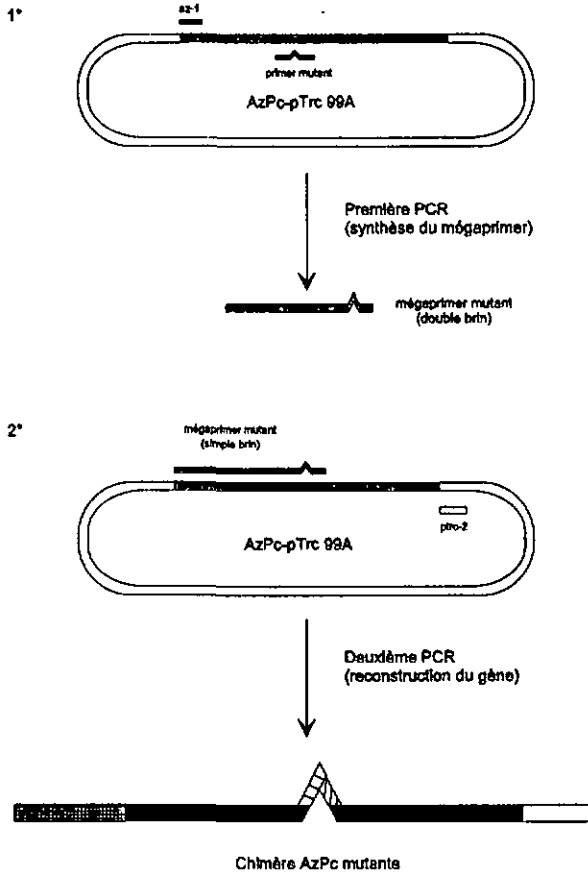


Fig. 24: Utilisation de l'amplification par PCR pour la mutagenèse dirigée (le mutation est symbolisée par une pointe).

2.4 Méthodes générales pour le génie des protéines

Matériels et méthodes sont ici présentés dans l'ordre de leur utilisation lors de la production de plastocyanine. L'annexe 1 décrit pas é pas la production de la plastocyanine recombinante.

2.4.1 Milieux de culture

Plusieurs milieux de cultures ont été testés, les plus utilisés se composent de tryptone et d'extrait de levure en plus ou moins forte concentration: TB, XB, LB

TB:	Tryptone	12 g	tampon:	KH ₂ PO ₄	2.31 g
	Yeast extract	24 g		K ₂ HPO ₄	12.54 g
	Glycérol	4 ml		Eau	50 ml
	Eau désionisée	900 ml			

Après autoclavage séparé, les deux solutions sont réunies stérilement.

XB:	Tryptone	25 g
	Yeast extract	7.5 g
	NaCl	5 g
	Eau désionisée	1 litre

LB:	Tryptone	10 g
	Yeast extract	5 g
	NaCl	10 g
	Eau désionisée	1 litre

Ce milieu de routine est également utilisé pour la croissance des bactéries destinées à la production de plasmides.

D'autres milieux spécifiques à certaines souches d'*E. coli* (BL21 [58]) a) ou à *Pseudomonas aeruginosa* b) ont été utilisés:

e)NZCYMG:	NZ emine A (Difco)	10 g	Ajusté à pH 7 et autoclavé
	Yeast extract	5 g	
	NaCl	5 g	
	Casamino acid	1 g	
	Eau désionisée	930 ml	

les solutions suivantes stérilisées par filtration à 0,22 μm y sont ajoutées:

+ MgSO_4 1M	10 ml
+ Glucose 8%	50 ml
+ CuSO_4 100mM	10 ml

M9gZB:	NZ emine A (Difco)	10 g	
	NaCl	5 g	Ajusté à pH 7 et autoclavé
	NH_4Cl	1 g	
	Eau désionisée	880 ml	
	+ tampon phosphate ¹⁾	50 ml	
	+ Glucose 8%	50 ml	ces solutions sont stérilisés
	+ MgSO_4 1M	10 ml	
	+ CuSO_4 100mM	10 ml	

¹⁾ tampon phosphate pH 7: KH_2PO_4 3g + Na_2HPO_4 6g + Eau désionisée 50ml

b) Milieu pour la croissance de *Ps. aeruginosa* en métabolisme de dénitrification:

Na citrate	5 g
Yeast extract	4 g
NaNO_3	5 g
KH_2PO_4	1 g
MgSO_4	0,5 g
CuSO_4	4 mg
FeCl_3	3 mg
Eau désionisée	1 litre

2.4.2 Fermenteurs

Les cultures-tests de faible volume ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250ml pour les cultures de 50ml et de 250ml à chicanes pour les cultures de 100ml, afin d'assurer une aération convenable du milieu.

Les culture-tests de plus grand volume (1 à 1,5 litre) ont été menées dans un fermenteur de type Multigène, New Brunswick Scientific, d'une capacité de travail de 1,8 litre, avec aération active à débit unique et constant, thermostatisation et agitation.

Les cultures de production (10 litres) ont été menées dans un fermenteur de type L 1523, Bioengineering, d'une capacité de travail de 12 litres, avec une aération active à débit réglable, thermostatisation, agitation et possibilité de suivre le pH.

2.4.3 Conditions de culture

Quelque soit le type de culture, la température est maintenue à 37°C. L'agitation pour les cultures en erlenmeyer est de 250 rpm et en fermenteur de 500 rpm. L'aération des cultures en erlenmeyer est optimisée en veillant à un haut rapport surface/volume ou par l'utilisation de récipients à chicanes, en petit fermenteur elle est fixée par le débit de la pompe à ~ 4 litres/minute, dans le grand elle est réglée à 16 à 20 litres/minute.

En règle générale, l'inoculum est une culture saturée de 1/20 de volume du même milieu que la culture.

La croissance des cellules est suivie à intervalles réguliers en mesurant la densité optique (D.O.) à 550nm, en prenant garde de diluer les prélèvements afin que la valeur mesurée soit comprise entre 0.03 et 0.3 (domaine de linéarité pour de telles mesures)

Les cellules sont induites à une D.O. à 550nm de 1 à 2 avec 1 à 5 mM final d'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside).

2.4.4 Centrifugation en continu

La sédimentation des grands volumes de culture (10 litres) est menée avec le système de centrifugation en continu de Sorvall® (Cf. Operating instructions, Sorvall® KSB continuous flow system, Ivansorvall Inc., Norwalk Connecticut 06852 USA 1969). Ce système permet de centrifuger n'importe quel volume en une seule opération. Les conditions de centrifugation pour une récupération optimale et des culots le moins compact possible (ce qui est important pour une resuspension aisée lors du choc osmotique) sont: température 10°C, vitesse 12'000 rpm, débit ~300 ml/minute.

La purification est suivie au spectrophotomètre et le plastocyanine est dosée selon un coefficient d'extinction moléculaire de 4900 M⁻¹cm⁻¹ à 597nm.

2.4.5 Choc osmotique

Le culot est repris dans 800ml de tampon 30 mM Tris-HCl pH 8 et 20% de saccharose. La suspension est laissée sous agitation lente (150 rpm) pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 6500g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est décanté et les cellules resuspendues rapidement, à la manière d'un shaker, dans 800ml de 0,5 mM MgCl₂ et 1mM CuSO₄ froid (4°C). La suspension est laissée sous agitation (150 rpm) pendant 20 minutes dans la glace. Le surnageant est récupéré par centrifugation 11500g pendant 20 minutes à 4°C, il contient la fraction péripasmique.

Plusieurs essais de purification de la plastocyanine ont été faits sur le surnageant de la première centrifugation. Durant ces essais, aucune trace de plastocyanine n'a été mesurée. On peut donc se débarrasser de ce surnageant et admettre l'efficacité de cette méthode.

Cette méthode de récupération de la fraction péripasmique se base sur les échanges osmotiques des cellules. En effet, les bactéries, dans la première solution (hypertonique: 20% saccharose), se vident de leur eau afin d'équilibrer les concentrations de part et d'autre de la membrane cellulaire et dans la deuxième (hypotonique) c'est l'inverse qui se produit. Ces mouvements de contraction et décontraction des cellules libèrent la fraction péripasmique voir figure 25. Cette méthode est également utilisée pour récupérer certains enzymes du cytoplasme [72].

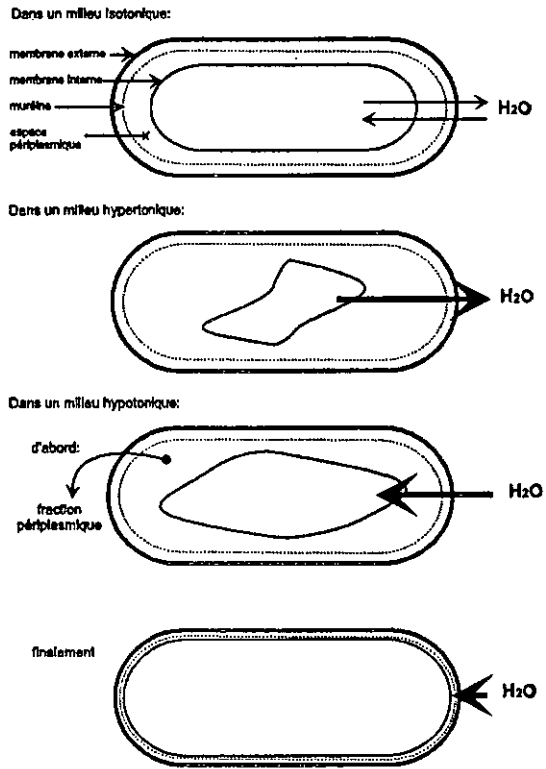


Fig. 25: Principe du choc osmotique.

2.4.6 Précipitation au sulfate d'ammonium

La solubilité des protéines dans un tampon aqueux dépend des interactions entre les protéines et l'eau. La solubilité peut être modifiée de trois manières:

- Par l'ajustement du pH. Une protéine est le moins soluble à son point isoélectrique, car il n'y a plus de forces électrostatiques répulsives entre les molécules de protéine.
- Par des solvants organiques, ils abaissent le constante diélectrique du milieu et favorisent les interactions de charges protéines-protéines au détriment des interactions protéine-eau, ce qui fait précipiter les protéines.

- Par l'élévation de la force ionique en ajoutant du sel, en pratique du sulfate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ car il est très soluble dans l'eau et qu'il n'a pas d'effets détériorant sur les protéines. Une protéine donnée précipite normalement à une faible concentration de sel. Ceci reflète que les agrégations protéines-protéines (par les régions hydrophobes - riches en résidus hydrophobes) dominent brusquement les interactions protéine-eau et protéine-sel. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation.

On peut dès lors utiliser ces principes de deux façons:

- soit on cherche à précipiter le plus sélectivement possible la protéine à purifier
- soit on précipite un maximum de contaminants.

Dans le chemin de purification de la plastocyanine recombinante j'ai choisi la deuxième façon. La fraction périplasmique, après adjonction de 1/20 de volume de 1M Tris-HCl pH 7,3, est précipitée par 70% de saturation de sulfate d'ammonium (436mg/ml), le précipité est éliminé par centrifugation: 12'500 g, 10 minutes, le surnageant contient - entre autres - la plastocyanine.

2.4.7 DEAE-cellulose (DiEthyl-Amino-Ethyl-cellulose)

La résine DEAE-cellulose provient de Whatman, la structure du groupe fonctionnel est présentée dans la figure 26.

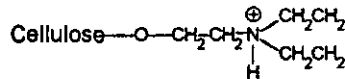


Fig. 26: Structure de groupe fonctionnel de la DEAE-cellulose.

Cette résine avec un pK_a de ~ 10 est une échangeuse d'anions. Cependant les résidus éthyl, en présence d'une forte concentration de sulfate d'ammonium, interagissent avec les régions hydrophobes des protéines [73], il s'agit alors d'une chromatographie d'interaction hydrophobe, comme avec les matrices octyl- ou phenyl-sepharose.

Environ 200 ml de résine sont équilibrés avec 5 volumes de colonne d'un tampon 50mM Tris-HCl pH 7,3 à la même concentration de sulfate d'ammonium que la fraction

périplasmique (436mg/ml). Après un lavage de deux volumes de colonne, les protéines sont éluées par un tampon 50mM Tris-HCl pH 7,3 et 30% de saturation de sulfate d'ammonium (136mg/ml), la plastocyanine migre avec le front de l'éluant.

Les propriétés physiques de cette résine assurent un grand flux et permettent une régénération vigoureuse avec 0,5M HCl et 0,5M NaOH. Ceci est important, car on peut la contaminer avec des particules insolubles sans que le flux ne soit par trop perturbé et que la résine soit irrémédiablement détériorée.

2.4.8 Tamissage moléculaire

Les fractions issues de la DEAE sont réunies et concentrées par ultrafiltration (Cf.: 2.4.10), jusqu'à un volume <10ml et chargées sur une colonne 2,6 x 95cm de tamissage moléculaire de type Sephadex (G-50F, Pharmacia) avec comme tampon d'éluion: 20mM Tris-HCl pH 7,3 et 50mM NaCl.

2.4.9 Echangeur d'ion sur FPLC

L'appareillage FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) et la colonne sont de chez Pharmacia. La dernière étape de purification est une chromatographie d'échange d'anions avec une colonne Q Hi-load Sepharose 26 x 10mm, avec comme groupe fonctionnel une amine quaternaire. La colonne est équilibrée avec le volume nécessaire de 20mM Tris-HCl pH 7,3. Les fractions issues de G-50 contenant la plastocyanine sont chargées et la plastocyanine est éluee par un gradient de NaCl de 0 à 350mM. L'annexe 2 décrit précisément la méthode.

Les fractions de plastocyanine pure (avec le rapport $Abs_{278}/Abs_{597} \sim 1$) sont récoltées, concentrées jusqu'à une $Abs_{597} \sim 2$ et dialysées dans 100mM tampon phosphate pH 7,0, finalement aliquotées et conservées à -20°C.

2.4.10 Système de concentration des solutions de protéines

Le système d'ultrafiltration pour la concentration des protéines provient de chez Amicon. La solution à concentrer est placée dans une cellule avec au fond une membrane filtrante de porosité choisie et une pression d'azote gazeux est appliquée per dessus le liquide. La membrane est choisie de manière à retenir toutes les tailles de protéines supérieures

ou égales à la plastocyanine. J'utilise le modèle YM3 (> 3'000 Da). Le modèle YM10 (>10'000 Da) bien qu'étant théoriquement adapté (la masse molaire de la plastocyanine = 10'390 Da) laisse passer trop de plastocyanine lorsque la solution est très concentrée.

2.4.11 Le purification de l'azurine recombinante

La première étape est un choc osmotique sur les cellules *E. coli*. La fraction péripasmique est acidifiée à un pH de 4,1 avec un tampon acétate, les contaminants dénaturés sont éliminés par centrifugation 20 minutes à 19500g à 4°C. Le surnageant est chargé sur colonne de CM-cellulose (carboxyméthyl-cellulose, cf. Fig. 27) et l'azurine est éluée avec un tampon acétate 20mM pH 5,1. Les fractions contenant l'azurine, présente sous forme d'apoazurine, sont révélées par 2 µl de CuSO₄ 1M, elles virent au bleu. Ces fractions sont concentrées jusqu'à un faible volume (<5ml) et chargées sur G-50F. L'azurine est alors pure.

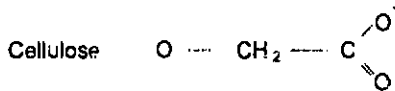


Fig. 27: Structure du groupe fonctionnel de la CM-cellulose

2.4.12 Techniques d'électrophorèse pour les protéines

L'analyse des étapes de purification, de la pureté des échantillons s'effectue par des méthodes d'électrophorèse. La première (SDS page: Sodium Dodecyl Sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) est une technique très utilisée pour l'analyse de routine. Les protéines sont dénaturées dans un tampon de charge (contenant du SDS et du mercaptoéthanol) et en chauffant 3 minutes à 100°C, avant d'être chargées sur gel. Ainsi la structure tertiaire est perdue et les protéines sont recouvertes de SDS, en moyenne 1,4g de SDS par gramme de protéine, ce qui a pour effet d'annuler toutes les éventuelles charges propre à la protéine. La charge globale du complexe SDS-protéine est donc seulement déterminée par la quantité de SDS recouvrant la surface de la protéine, donc par la taille de la protéine.

La séparation du mélange de protéines dans un champ électrique amènera les plus petites plus loin dans les mailles de polyacrylamide que les grandes.

Le système utilisé (Minigel, System Laemmli [74], Mini Protean II) est commercialisé par Biorad.

Le système se compose de deux gels de concentration différente. Un gel de séparation d'une concentration en acrylamide de 12%, surmonté d'un gel de concentration d'une teneur en acrylamide de 4%. Ce deuxième gel a pour effet d'amener toutes les protéines en même temps au début du gel de séparation (stacking) et d'empêcher la diffusion pendant le "stacking".

Composition du tampon de charge et des gels:

a) Tampon de charge:

Tris-Cl 1M pH 8.8	1,2 ml
10%SDS	2 ml
87% Glycérol	1 ml
1% Bleu de bromophénol	0,05 ml
Mercaptoéthanol (14M)	0,05 ml
Eau Milli-Q	5,25 ml

b) Gel de séparation:

Tempon Tris-Cl 1M pH 8,8	2 ml
30% acrylamide	3,2 ml
10% SDS	0,08 ml
Eau Milli-Q	2,68 ml
Dégazer 15 minutes aux ultrasons, puis ajouter:	
10% APS	0,04 ml
TEMED	4 μ l

Temps de polymérisation: 45 à 60 minutes

c) Gel de concentration:

Tampon Tris-Cl 0,5M pH 6,8	1,25 ml
30% acrylamide	0,65 ml
10% SDS	0,05 ml
Eau Mili-Q	3,02 ml
Dégazer 15 minutes aux ultrasons, puis ajouter:	
10% APS	25 μ l
TEMED	5 μ l
Temps de polymérisation: 30 à 45 minutes	

Une autre technique d'électrophorèse se base sur les variations de la charge globale d'une protéine en fonction du pH, c'est l'électrophorèse de focalisation isoélectrique (pagIF: polyacrylamide gel Isoelectric Focusing)

La matrice de polyacrylamide contient des ampholytes avec différents pK_a de manière à couvrir un domaine de pH donné. Ces ampholytes sont alors titrés en plaçant sur l'anode une solution acide et sur la cathode une solution basique, le champ électrique établit alors un gradient de pH dans le gel.

L'utilisation de cette technique pour la plastocyanine nécessite une modification. En effet le plastocyanine précipite à un pH~5, or son point isoélectrique se situe à ~4,2. L'ajout d'un détergent non chargé comme le Triton X-100 résoud partiellement le problème.

Les échantillons doivent être complètement désalés pour éviter tous problèmes dans la migration et obtenir des bandes droites.

Composition des solutions:

a) Acrylamide:	acrylamide	9,9 g
	bisacrylamide	0,3 g
	Eau Mili-Q	ad 100 ml
Ajouter ~1 g d'Amberlite et agiter faiblement pendant une heure, afin d'éliminer tous les ions et filtrer la solution sur papier.		

b) Gel:	Acrylamide	18	ml
	empholytes (pH 2,5-5)	1,9	ml
	glycérol (87%)	4	ml
	Triton (10%)	6	ml
	Eau Mili-Q	100	µl

Dégazer 3 minutes aux ultrasons et ajouter:

APS (22,8 mg/ml) 300 µl

TEMED 25 µl

Temps de polymérisation: 8 à 12 heures.

c) Solution de titration:

solution acide: 0,04M d'acide aspartique

solution basique: 0,1M de NaOH.

2.4.13 Méthode rapide de coloration des gels SDS

1. Tremper le gel dans la solution de fixation à température ambiante et placer le tout au four à micro-ondes à 450 Watt pendant 5 minutes.
2. Tremper le gel dans la solution de coloration au bleu de Coomassie à température ambiante et chauffer au four à micro-ondes à 450 Watt pendant 5 minutes.
3. Retremper le gel dans la solution de fixation et placer au four à micro-ondes à 450 Watt pendant 5 minutes.
4. Tremper le gel dans la solution de décoloration à température ambiante avec un morceau de mousse synthétique pour trapper le colorant et placer le tout au four à micro-ondes à 450 Watt pendant 10 minutes.

Solution de fixation: 625 ml d'isopropanol
250 ml d'acide acétique
compléter à 1000 ml avec de l'eau Mili-Q.

Solution de coloration: 2,5 g de bleu de Coomassie R-250
500 ml de méthanol
100 ml d'acide acétique
compléter à 1000 ml avec de l'eau Mili-Q.

Solution de décoloration: 50 ml de méthanol
70 ml d'acide acétique
compléter à 1000 ml avec de l'eau Mili-Q.

2.4.14 Méthode rapide de coloration des gels IF

Le coloration des gels IF suit le même protocole que pour les gels SDS, seule la composition des solutions change.

Solution de fixation: 57,5 g d'acide trichloroacétique
17,25 g d'acide sulphosalicylique
ajoutés à 500 ml avec de l'eau Mili-Q.

Solution de coloration: 0,46 g de bleu de Coomassie R-250
400 ml de solution de décoloration.

Solution de décoloration: 250 ml de méthanol
80ml d'acide acétique
compléter à 1000 ml avec de l'eau Mili-Q.

Le gène de l'azurine est sous-cloné dans le vecteur pTrc 99A via les sites Nco I et Bam HI. Il a servi de template pour l'amplification du mégaprimier hybride contenant le peptide signal de l'azurine.

Avec ce mégaprimier, le primer pc-2 et comme ADN template pour le gène de la plastocyanine un ADNc de jeunes feuilles d'épinard, j'ai obtenu une chimère de 431 paires de base (pb). Cette chimère est sous-clonée dans le vecteur pTrc99A et séquencée par PCR. La séquence est correcte à une base près. En effet, le nucléotide 275 (en gras dans la figure 29) est un "G", le codon initialement GAA est devenu GGA et un acide aminé Glycine remplace le Glutamate en position 68.

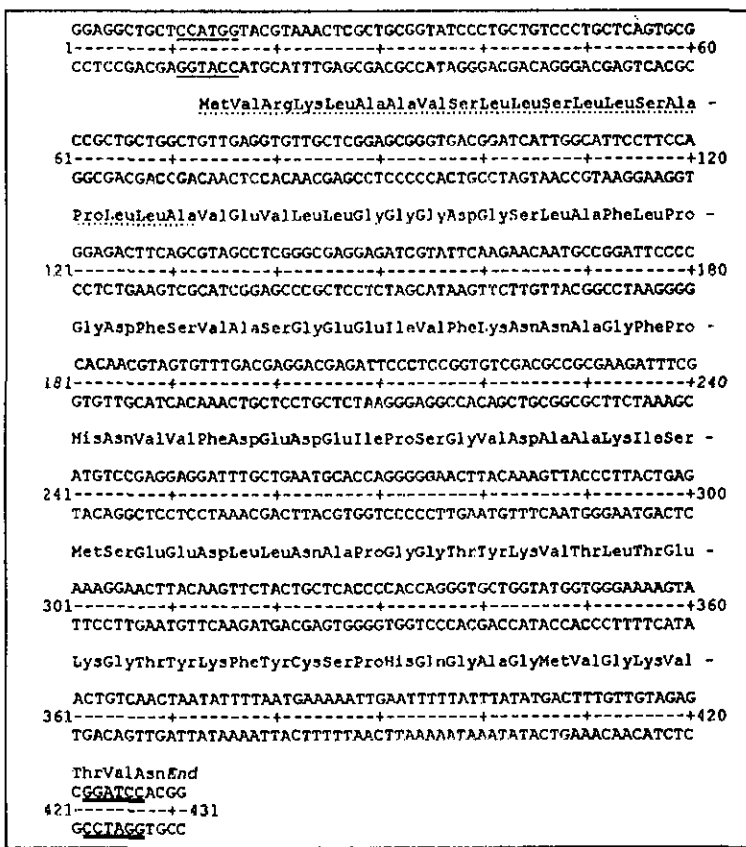


Fig. 29: Séquence de la chimère AzPc (le peptide signal de l'azurine est souligné en pointillé, le site NcoI en plein et le site Bam HI deux fois, en gras la faute en position 68.)

J'ai renouvelé cette démarche plusieurs fois avec plusieurs types d'ADN polymérase et à chaque fois la même erreur c'est glissée. C'est alors posée la question de l'intégrité de l'ADNc servant de template. L'ADNc contient-il une erreur ? Ce qui est possible, l'enzyme transcriptase inverse utilisé pour la conversion de l'ARNm en ADNc n'a pas d'activité "proof reading". J'ai donc choisi un autre ADN template, l'ADN chromosomique de l'épinard et les primer pc-1 et pc-2. La séquence du gène ainsi amplifié contient également la même erreur!

Et il s'agit donc bien d'une erreur de la séquence de ma chimère et non pas de la séquence publiée de la plastocyanine [33]. La perte d'une charge (l'acide aminé Glutamate est remplacé par Glycine) modifie le pI de la plastocyanine: 4,26 pour la native contre 4,20 pour la Pc E68G. Cette différence est visible sur pagIF, 0,025 unité pH/mm (Fig. 30).

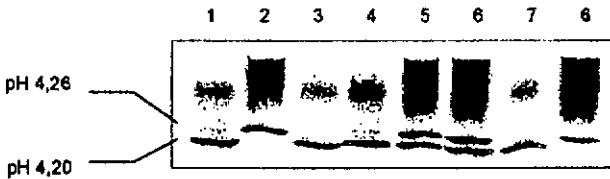


Fig. 30: Gel IF des plastocyanines E68G, native et wild type.

1 Pc nt, 2 Pc E68G, 3 Pc wt, 4 Pc nt + wt, 5 Pc nt + E68G, 6 Pc wt + E68G,
7 Pc L12G, 8 Pc E68G L12A.

Les traces sont dues à l'instabilité de la plastocyanine à de tels pH.

Le faute serait alors commise par l'ADN polymérase (Taq) utilisée lors de l'amplification du gène. Il est connu que les ADN polymérases commettent des fautes. Les fréquences d'erreurs figurent dans leurs caractéristiques fournies par le fabricant. Quelque chose, une structure secondaire de l'ADN p.à.x., pourrait provoquer ce comportement de la Taq. Ce qui est cependant curieux, c'est que cette erreur soit toujours la même, commise au même endroit. Une situation similaire s'est produite lors de l'emplification de la sous-unité b) de la FTR (ferrédoxine thiorédoxine réductase) dans notre laboratoire [75]. La comparaison des séquences de cette sous-unité et de la plastocyanine n'a pas montré de similitudes évidentes qui permettraient de déduire le raison du comportement de la Taq.

C'est par mutagenèse dirigée que j'ai corrigé cette erreur.

3.1.2 Mutagenèse dirigée

La correction de l'erreur en position 68 avec le primer ø68 a abouti et j'ai ainsi obtenu une chimère contenant le gène correct de la plastocyanine. Si l'ADN polymérase n'a pas rétabli la faute lors des PCR de cette mutagenèse et des suivantes, je suppose que c'est dû au fait que les templates utilisés sont beaucoup plus courts que l'ADNc ou l'ADN chromosomique d'épinard. La probabilité de la formation d'une structure secondaire est alors plus faible

En plus de AzPc wild type, la mutagenèse dirigée a produit six autres clones. Deux contiennent également la faute en position 68: AzPc L12G E68G et AzPc L12A E68G, car l'ADN ayant servi de template est la chimère AzPc fautive. Quatre sont mutés en une seule position: AzPc L12G, AzPc L12A, AzPc L12V et AzPc L12F (Fig. 30).

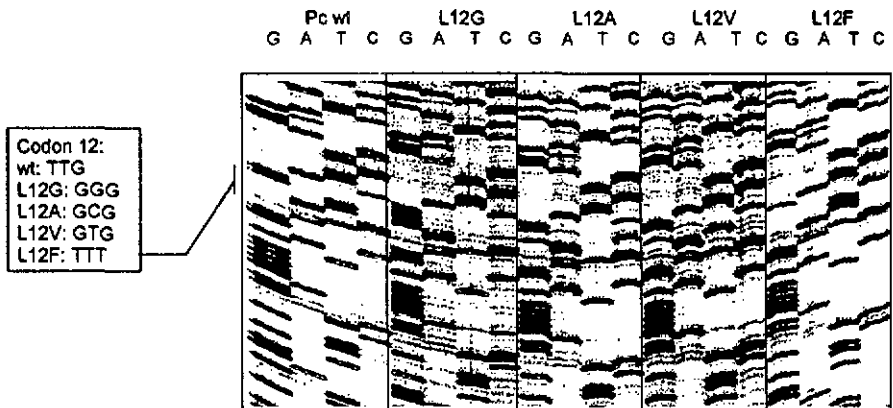


Fig. 31: Autoradio des séquences de Pc wt et des mutants de la position 12.

J'ai donc é exprimer en plus de l'Azurine, huit plastocyanines différentes: Pc wt, Pc E68G, Pc L12G E68G, Pc L12A E68G, Pc L12G, Pc L12A, Pc L12V et Pc L12F.

3.2. En biochimie

3.2.1. Production de l'ezurine

Deux systèmes d'expressions ont été testés pour la production d'azurine. Le vecteur pET 3d avec *E. coli* BL 21 (DE3) et le vecteur pTrc 99A et *E. coli* JM 105. Le premier système est inadéquat, l'ezurine n'est pas produite. En effet, aucune trace d'azurine n'est décelée, quelque soit la concentration d'IPTG (0,5 ou 5mM) et le milieu utilisés: NZCYM, M9gZB, LB ou TB, bien que tous assurent une bonne croissance des cellules (Tableau 2).

Le deuxième par contre fournit une bonne quantité de protéine pure: ~75mg par litre de culture. Les cellules sont cultivées dans un fermenteur de 1,5 l et le milieu TB. T_0 est le moment de l'inoculation. L'induction avec 1mM d'IPTG a lieu à une D.O. à 550nm = 1 à T_0 + 1heure environ. La culture est stoppée 4 heures après l'induction à une D.O. de ~15 à T_0 + 5 heures. L'extrait total des protéines cellulaires avant et 4 heures après l'induction montre sur gel SDS une nette surexpression de l'azurine (Fig. 32 et Tableau 2).

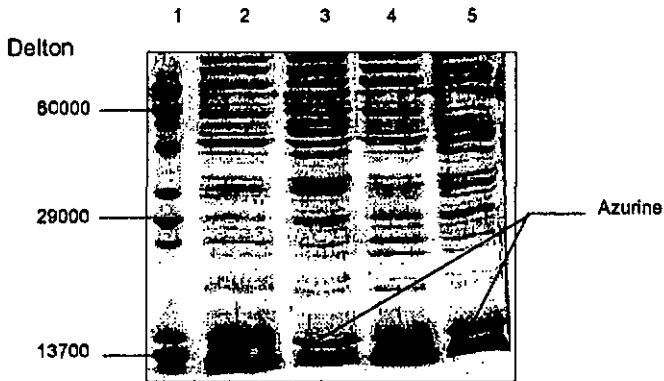


Fig. 32: Gel SDS des protéines totales avant et après induction.

1 Marqueur de taille, 2 et 4 protéines totale event induction, 3 et 5 après induction

Tableau 2: Résultats qualitatifs des tests de conditions de production de l'azurine.

Le taux de croissance est établi à un temps $T_0 + 5$ heures.

* indiquent des cultures de 1,5 litre.

Vecteurs	Cellules	Milieux et taux de croissance					Azurine (SDS)
		NZCYM	M9gZB	LB	XB	TB	
pET 3d	BL 21(DE3)	++					-
			+				-
					+		-
						++	-
							+++
					+++*	-	
pTrc 99A	JM 105					+++*	++++

- : résultats négatifs

La purification de l'azurine a suivi le protocole décrit dans [66] en omettant le deuxième passage sur CM-cellulose. Il serait cependant intéressant d'optimiser la purification. L'utilisation d'une résine sulfopropyl-Sepharose et d'un gradient de pH serait préférable. Le flux à travers la cellulose est très lent, alors que la Sepharose assure un meilleur débit, ce qui est important lorsque le volume à charger atteint plus d'un litre. De plus, le groupe fonctionnel de la sulfopropyl est un acide fort, son affinité pour les cations ne varie pas en fonction du pH, contrairement au groupe carboxyl.

Parallèlement, j'ai tenté d'extraire l'azurine native à partir d'une culture de *Pseudomonas aeruginosa*. Deux cultures en fermenteur de 1,5 litre avec le milieu de culture pour *Ps. aeruginosa* ont été menées, l'une en condition aérobie, l'autre en anaérobie (un flux d'azote remplaçait l'air). La purification de la protéine a suivi le même chemin que la recombinante. Je n'ai cependant pas détecté d'azurine dans ces extraits. Le fait que l'expression de l'azurine recombinante fonctionnait et que *Ps. aeruginosa* est un organisme pathogène a conduit à ce que je ne renouvelle pas cette expérience.

3.2.2. Production de la plastocyanine

3.2.2.1 Tests des conditions d'expression

L'établissement des conditions de production a été mené avec le clone AzPc E68G, premier en ma possession.

Suite aux conclusions de Chang et al. [67], j'ai choisi d'ajouter à tous les milieux de culture 1mM de CuSO_4 . Ce qui favorise la formation, à partir de l'epoplastocyanine, de l'holoplastocyanine, qui est plus résistante aux protéases.

Une série de tests a été réalisée en cultures "ministyles" (50 à 100ml). Ces cultures-test visaient à établir les conditions (milieu, concentration en IPTG, vecteur et bactérie) pour obtenir une surproduction de la plastocyanine à l'image de celle obtenue pour l'azurine (Fig. 32). Ces tests sont complétés par des cultures en fermenteur de 1,5 litre, dans les cas où une confirmation à plus grande échelle était nécessaire. L'estimation de la croissance cellulaire a été faite par des mesures de D.O. à 550nm. La production de la plastocyanine a été visualisée sur gel SDS et le cas échéant, la quantité a été estimée par une mesure à 597nm de la fraction périplasmique en présence de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

Les tests "ministyles" sont toutefois à considérer avec certaines réserves: une petite culture en erlenmeyer n'est pas proportionnelle à une culture en fermenteur, les conditions d'aération et d'agitation sont trop différentes. Cette manière permet néanmoins de comparer les systèmes entre eux, sans pour autant prédire des résultats quantitatifs pour les cultures en fermenteur.

Les tentatives d'expression ont été menées avec le vecteur d'expression pET 3d, dans les cellules *E. coli* BL21 (DE3). Ce vecteur n'a donné aucun résultat pour la production de la plastocyanine. Une série de cultures-test "ministyle" associe ce système à différents milieux sans autre résultat que d'établir le milieu TB comme le meilleur pour la croissance des cellules (cf Tableau 3). Une confirmation est obtenue avec une culture de 1,5 litre de TB en fermenteur avec une induction à 5 mM IPTG. La fraction périplasmique a subi une précipitation au sulfate d'ammonium et une DEAE. Dans ces conditions, aucune expression n'est décelée ni sur gel SDS, ni aux anticorps contre la plastocyanine, ni au spectrophotomètre.

Le système associant le vecteur pTrc 99A et les cellules JM 105 assure une expression de la plastocyanine. Elle est peu visible sur gel SDS avec une coloration au bleu de coomessie, mais est claire aux anticorps malgré de nombreuses réactions croisées.

Ce système a été testé avec différents milieux: LB, XB et TB (cf Tableau 3). C'est dans le TB que les JM 105 poussent le mieux et la production de plastocyanine y semble la meilleure. Si le vecteur pTrc 99A est associé aux bactéries BN 103, la vitesse de croissance dans le milieu TB diminue et la production de plastocyanine n'est pas visiblement meilleure.

Avec le vecteur pKK et les cellules BN 103 dans le milieu TB, l'expression est toujours présente mais légèrement plus faible et le taux de croissance diminue. De plus ce vecteur est connu pour être en faible nombre de copies dans les cellules. L'expression n'est pas meilleure si on l'associe aux JM 105 et le taux de croissance est encore plus bas (Tableau 3).

Tableau 3: Résultats qualitatifs des tests de production de la plastocyanine.

Le taux de croissance est établi à un temps $T_0 + 5$ heures.

Dans la production de plastocyanine seules les mesures

spectrophotométriques permettent une estimation qui peut être comparée.

Vecteurs	Cellules	Milieux et taux de croissance					Production de la plastocyanine		
		NZCYM	M9gZB	LB	XB	TB	SDS	Anticorps	A_{567nm}
pET 3d	BL 21	++					-	-	-
			+				-	-	-
				+			-	-	-
					++		-	-	-
pTrc 99A	JM 105			++		+++	-	-	-
					++		+	+	++
						++	+	+	+++
	BN 103					+++	+	+	++
pKK-233	BN 103					+++	+	+	++
	JM 105					++	+	+	++

- : résultats négatifs.

Les derniers tests ont permis d'établir la concentration d'IPTG à utiliser pour l'induction. En cultures-test "ministyle" de 50ml TB avec le vecteur pTrc 99A et les cellules JM 105, il n'y a pas de différences visibles à utiliser 1 mM ou 5 mM final d'IPTG. Pour des raisons économiques j'ai donc choisi pour induire les cultures 1mM d'IPTG.

Aucune des situations étudiées ne montrent une surexpression à l'image de celle de l'azurine. A défaut d'avoir pu mettre en place un tel système, j'ai choisi les conditions suivantes pour la production de la plastocyanine:

Vecteur:	pTrc 99A
Souche:	JM 105
Milieu:	TB + 1mM CuSO ₄
IPTG:	1 mM
Température:	37°C

Ces conditions ont été retenues pour essentiellement deux raisons:

- Le vecteur pTrc 99A a un meilleur taux de répllication que le pKK 233.
- Elles assurent le meilleur couple: vitesse de croissance - production de la plastocyanine, établi selon des mesures qualitatives.

Dans ces conditions la croissance des cellules suit une courbe classique (Fig. 33). La phase de latence dure environ 100 minutes, et atteint une D.O. ~1. C'est alors le moment de l'induction. Puis une phase exponentielle d'environ 5 heures précède le début de la phase stationnaire.

Tout au long de la culture le pH varie systématiquement de la manière suivante: tout d'abord une légère diminution de pH 7 à 6,8, qui s'accroît jusqu'à pH 6,6 à la fin de la phase exponentielle. Une alcalinisation du milieu suit jusqu'à la phase stationnaire avec un pH de 7,5. Cette alcalinisation s'associe à l'apparition d'une abondante mousse dans la culture, toutes deux dues à l'éclatement de bactéries. Il faut stopper la culture, les cellules sont alors récoltées, ~ 6 heures après l'induction.

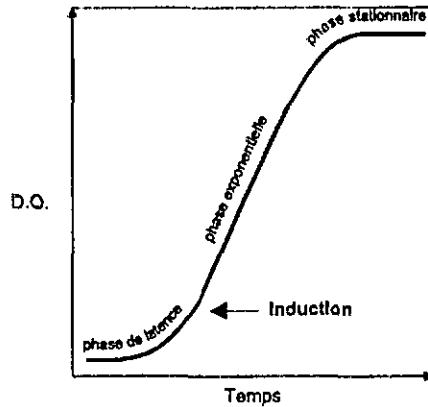


Fig. 33: Courbe théorique de la croissance des bactéries.

Le recul me permet de remarquer certaines lacunes dans le déroulement des cultures-test. Un travail ayant pour but de déterminer précisément le système le plus efficace pour l'expression de la plastocyanine devrait être conduit de manière plus précise.

Le volume des cultures-test ne doit pas être inférieur à 100ml dans un erlenmeyer à chicanes de 500ml, pour une bonne aération. Aux mesures de la D.O. doivent s'ajouter de mesures de poids sec des cellules. La quantité de plastocyanine produite doit être non plus estimée par l'absorbance à 597nm sur la fraction périplesmique oxydée mais sur les fractions réunies après DEAE. Le signal est alors plus important et sort nettement du bruit de fond. Cette mesure permettant d'estimer également la quantité de protéine totale à 278nm, l'échantillon étant débarrassé des acides nucléiques.

Il serait également important de tester d'autres vecteurs, comme le pSBET qui contient le gène d'un ARNt rare chez *E. coli* [76]. Ainsi que d'autres milieux, dont certains sont conçus de manière spécifique à favoriser la réplication de l'ADN, la transcription etc...

Il est également possible de réduire la phase de latence de la culture en l'inoculant avec une préculture dont les cellules sont en pleine phase de croissance exponentielle et non avec une préculture saturée.

3.2.2.2 Résultats des expériences établissant le chemin final de purification

La resuspension des cellules dans la solution A du choc osmotique, doit être soignée pour éviter de casser les cellules. L'utilisation d'un tube de Potter accélère la manipulation mais un usage prolongé élève le nombre de cellules cassées et par conséquent la quantité d'acides nucléiques libérés est plus importante qu'avec une pipette pasteur.

La centrifugation avant la solution B donne l'occasion de voir la proportion de cellules cassées. Elles sédimentent plus lentement et constituent une couche distincte au dessus du culot. La resuspension dans la solution B est énergique, ce qui conduit au choc.

A partir du choc osmotique, deux voies ont été testées. a) La première consiste à concentrer par ultrafiltration la fraction périplasmique pour la charger directement sur G-50F. b) La deuxième comprend avant le tamisage, une précipitation au sulfate d'ammonium et une chromatographie sur DEAE.

a) L'efficacité de la séparation est faible. La résolution est mauvaise: les fractions contenant la plastocyanine sont confondues avec les grandes protéines.

De plus la concentration de la fraction périplasmique pose trois problèmes: les particules en suspension bouchent le filtre, les acides nucléiques présents augmentent la viscosité enfin le grand volume (800 ml) nécessite une longue concentration.

Deux de ces trois points ont leur solution. Une centrifugation prolongée et/ou plus puissante ou une filtration peuvent débarasser la solution des particules en suspension. Un traitement à l'ADN/ARN nucléases fractionne les acides nucléiques et diminue la viscosité de la solution, mais une incubation à 37°C pendant une heure est nécessaire.

Ces solutions sont longues à appliquer et l'incubation de la deuxième peut être néfaste pour la plastocyanine, qui n'est pas thermostable.

b) La deuxième voie s'inspire largement du début de la méthode de purification de la plastocyanine d'épinard établie par Schürmann. Il s'agit de précipiter le choc osmotique avec une concentration de sulfate d'ammonium correspondant à 80% de saturation et de le charger sur DEAE. Suit un lavage à 60% de saturation et enfin l'élution à 30%. La plastocyanine migre avec le front du tampon.

Quelques modifications ont été apportées à ce protocole. La quantité de sulfate d'ammonium pour précipiter le choc osmotique est ramenée à 70%. J'ai en effet constaté

que trop de plastocyanine précipitait à 80%. J'ai également constaté que le lavage à 60% faisait migrer la plastocyanine, je l'ai ramené à 70% et finalement supprimé, car il n'apporte pas de sensible amélioration dans la purification de la protéine recombinante.

L'utilisation d'un gradient de 70 à 0% de sulfate d'ammonium a été testé pour l'élution. Ce type d'élution, nécessitant la mise en place de tout un appareillage, n'améliore pas sensiblement le rapport de pureté (A_{278}/A_{597}) mais augmente le volume des fractions contenant la plastocyanine. Étant donné que l'étape suivante est une ultrafiltration, l'utilisation d'un gradient a été abandonnée.

La solution issue de DEAE est limpide, exempte d'acides nucléiques et de volume 5 fois plus petit que celui chargé. La concentration est alors plus facile et plus courte - malgré la forte teneur en sulfate d'ammonium.

Le tamisage sur G-50F est alors plus efficace, les fractions contenant la plastocyanine se détachent des grandes protéines. J'ai tenté d'optimiser les conditions d'élution. Le NaCl contenu dans le tampon vise à atténuer les interactions de charge entre les protéines. L'élévation de sa concentration de 50 mM à 250 mM ou 500 mM, n'augmente pas l'efficacité de cette chromatographie. De plus une concentration plus élevée que 50 mM en NaCl poserait un problème pour l'étape suivante, l'échangeuse d'anions.

Des tests avec Mono-Q 1ml (Pharmacia, Annexe 5) ont établi que l'élution de la plastocyanine avec un gradient de 0 à 350 mM était optimal. Avant le gradient, la colonne est lavée par un volume de colonne de tampon sans NaCl, ce qui élue les protéines chargées positivement au pH utilisé.

Pour les productions à grande échelle le choix s'est porté sur une colonne Q Hiload (60 ml) qui permet de séparer en un passage l'ensemble d'une préparation en conservant les avantages de rapidité, de maniabilité - notamment au niveau du collecteur de fractions - de la FPLC (Annexe 2).

Cette dernière étape conduit à une plastocyanine pure. Elle sépare les formes oxydée (pic A) et réduites (pic B) (Fig. 33). En fait, le pic B, dit de plastocyanine réduite, est une solution incolore, qui vire au bleu à l'ajout de ferricyanure, qui n'atteint cependant jamais un rapport de pureté (A_{278}/A_{597}) équivalent à la plastocyanine du pic A. Néanmoins, le spectre CD et le spectre UV (250 à 300 nm) de cette solution correspond bien à la plastocyanine. La taille de ou des protéines de cette solution est égale à celle de la plastocyanine. Il s'agit sans doute d'un mélange de plastocyanines mal formées n'ayant

pas de cuivre, ou ayant incorporé un autre ion métallique présent en trace dans les tampons utilisés tout au long de la production, et de plastocyanine réduite.

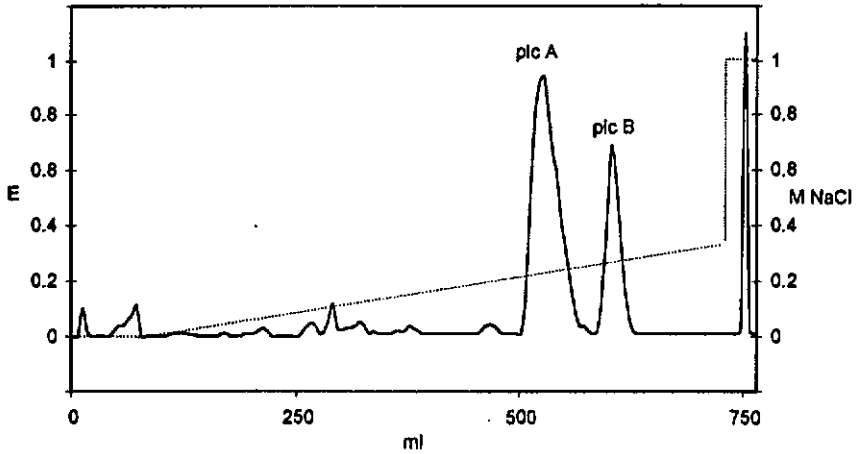


Fig. 33 Profil d'élution de la plastocyanine recombinante après G-50, sur Q-Hiload (FPLC), tampon: 20mM Tris-HCl pH 7.3, élution avec un gradient 0 à 350 mM NaCl (----).

3.2.2.3 Détails des résultats de la production d'une plastocyanine

Cette description concerne la plastocyanine wild type

a) La culture

La culture des *E. coli* JM 105 contenant le plasmide AzPc wt-pTrc99A a poussé selon une courbe classique jusqu'à une D.O. de ~ 30 (Fig. 34). Le pH a varié selon le schéma habituel et eu pH 7,4 les cellules ont été récoltées. J'ai obtenu 160 g de bactéries, poids frais.

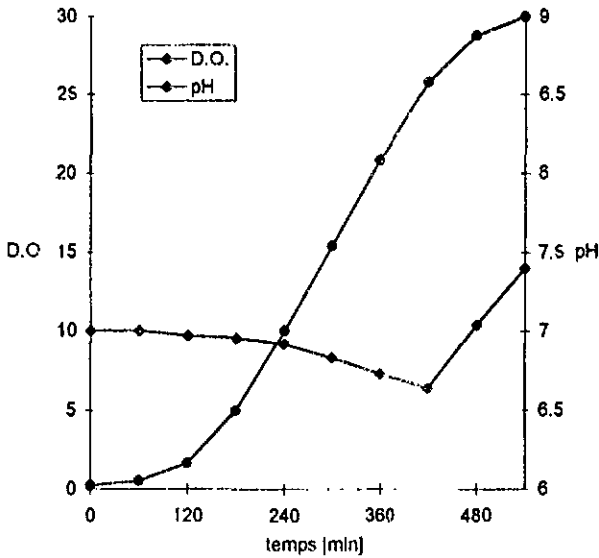


Fig. 34: Variation de la D.O. et du pH en fonction du temps.

b) Le choc osmotique

- Dans le cas de la Pc wt, j'ai eu un volume de fraction périplasmique de 830 ml avec une $A_{597} = 0,2178$. La quantité totale de plastocyanine est alors de 383,3 mg. Cette solution contient beaucoup d'acides nucléiques, $A_{280} \sim 2,5$. Ils peuvent être gênant pour la suite et interdisent un passage direct sur G-50F pour des raisons de viscosité.

c) La précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium 70% de saturation laisse la plastocyanine en solution tout en éliminant une partie des contaminants. Elle ne débarrasse cependant pas la solution des acides nucléiques.

- Le surnageant de la précipitation a un volume de 1000 ml, une $A_{597} = 0,1655$ et une quantité totale de plastocyanine égale à 350,9 mg.

d) La chromatographie sur DEAE

Outre l'élimination de contaminants protéiques, cette chromatographie débarrasse la solution des acides nucléiques. Cette étape tient lieu de concentration, le volume élué contenant la plastocyanine ne représente en moyenne que 1/5^e du volume chargé. De plus elle sert de filtration. En effet le surnageant issu de la précipitation n'est pas complètement limpide, ce qui nécessiterait une centrifugation beaucoup plus longue. Or cette résine permet un flux important, qui n'est pas sensiblement gêné par les particules en suspensions et sa robustesse permet une régénération aisée avec HCl et NaOH.

- Le volume élué de la DEAE contenant la Pc wt est de 125 ml avec une $A_{597} = 0,8757$ et une quantité totale de plastocyanine égale à 232,13 mg. Les acides nucléiques ont disparus.

e) Le tamisage moléculaire sur G-50

Sans pour autant offrir une séparation à la ligne de base, cette étape débarrasse la plastocyanine de la majorité des contaminants de grande taille. Le tamisage moléculaire a un avantage important, il n'entraîne pas de pertes importantes.

- Le volume élué de le G-50F contenant la Pc wt est de 71 ml avec une $A_{597} = 1,3974$ et une quantité totale de plastocyanine égale à 210,37 mg.

f) La chromatographie sur Q Hi-load

- Le volume du pic A de la Q Hi-load contenant la Pc wt est de 96 ml avec une $A_{597} = 0,8837$ et une quantité totale de plastocyanine égale à 179,90 mg.

g) Résumé des différentes étapes.

- La purification de la Pc wt étape par étape est résumé dans le tableau 4 et la figure 35. La quantité de plastocyanine totale pour la fraction périplasmique et le surnageant de la

précipitation au sulfate d'ammonium sont à considérer avec réserves tant le signal du spectrophotomètre est faible et les volumes grands. Les figures 36 et 37 donnent une bonne vision de l'effet des différentes étapes de la purification.

Tableau 4: Le rendement des différentes étapes de purification de la Pc wt.

Etape	Choc osmotique	Précipitation	DEAE	G-50F	Q Hload
Voluma (ml)	830	1000	125	71	96
Rapport UV/Vis	83.58	45.28	6.38	1.62	1.08
Pc wt totale (mg)	383.30	350.90	232.13	210.37	179.90
Pc wt relative (%)	100	92	61	55	47
Pertes relative (%)		8	34	10	15

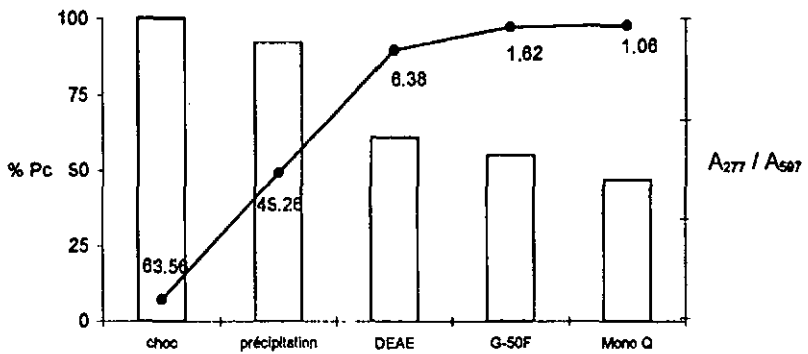


Fig. 35: Visualisation graphique de l'efficacité des différentes étapes de purification de la Pc wt.

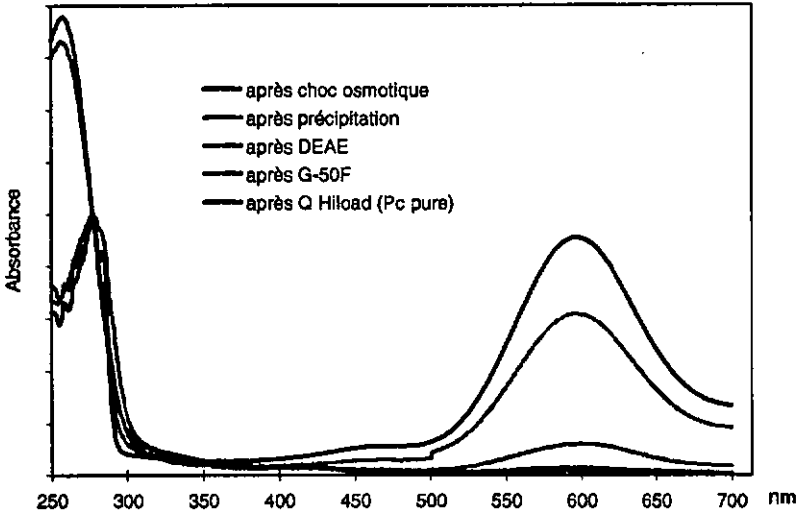


Fig. 36: Superposition des spectres UV/vis des différentes étapes de la purification de la Pc wt. Les valeurs des spectres ont été normalisées à $A_{277} = 1$ pour être comparables.

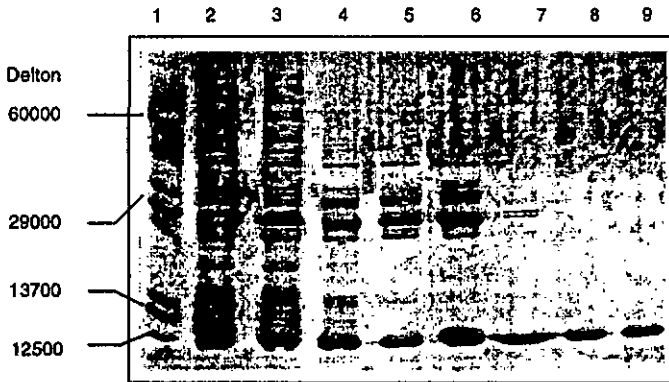


Fig. 37: Gels SDS des différentes étapes de la purification de la Pc wt. 1: marqueur, 2: protéines totales avant induction, 3: après induction, 4: fraction périplesmique, 5: après précipitation au sulfate d'ammonium, 6: après DEAE, 7: après G-50F, 8: après Q Hiload, 9: plastocyanine pure d'épinard. (L'image numérisée de ce gel a été retouchée dans les contrastes et la luminosité pour une meilleure vue.)

3.2.2.4. Résultats globaux de la production des différents mutants de la plastocyanine

Remarques générales sur la production de la plastocyanine:

Au fur et à mesure des cultures s'acquiert l'expérience de l'expression de la plastocyanine. Cette expérience, complétée par des échanges de point de vue entre collègues, conduit à plusieurs améliorations. Les optimisations de la production n'ont pour le plupart pas été testées de manière rigoureuse et strictement comparative, cependant elles sont efficaces.

J'ai ainsi remarqué qu'il faut purifier la fraction péripasmiq ue rapidement, l'idéal est d'enchaîner les étapes jour après jour (cf annexe 1). Il faut impérativement éviter de congeler et décongeler le produit des différentes étapes ou de les conserver à 4°C eu delà de 72 heures. Mais si une étape est reportée il est tout de même préférable de stacker la solution à 4°C plutôt que de le congeler. La plastocyanine pure doit être conservée à -20°C en aliquots concentrés $A_{687} \sim 2$, d'un volume correspondant à une utilisation journalière. Il faut éviter de devoir recongeler un aliquot.

Pour un bon rendement les bactéries doivent être transformées fraîchement. L'idéal est une transformation la veille de la préculture. Il est en effet possible qu'avec le temps les bactéries rejettent le plasmide ou ne le répliquent plus de manière optimale. De plus, la conservation des cellules en milieu liquide ou solide entraîne un vieillissement, une "fatigue" des bactéries.

Résultats de la production des plastocyanines:

Le système utilisé assure la production de chacune des plastocyanines, à l'exception de Pc E68G L12G (Tableau 5). Deux cultures en fermenteur de 1,5 et 8 litres n'ont pas abouti à l'expression de cette protéine sous une forme fonctionnelle. L'analyse par immunoblot de la fraction péripasmiq ue montre que l'apoplastocyanine est produite. La stabilité du complexe Cu^{2+} - apoprotéine est-elle trop faible ou l'apoprotéine n'incorpore-t-elle pas le Cu^{2+} ? Toujours est-il que cette situation semble être eu delà de la limite de fonctionnalité de la plastocyanine. En effet Pc E68G L12A est fonctionnelle.

Tableau 5: Résultats des productions des plastocyanines recombinantes.

Protéine	exp. n°	volume de culture	rapport UV/Vis	mg pc total	mg pc / litre de culture
Pc wild type	1	1,5 l	1,27	12	8
	2	10 l	1,16	95	9,5
	3	10 l	1,08	180	18
Pc L12G	1	1,5 l	1,1	3	2
	2	10 l	1,32	13	1,3
	3	10 l	1,2	6	0,6
Pc L12A	1	1,5 l	1,16	9	6
	2	10 l	1,07	50	5
	3	10 l	1,1	70	7
	4	10 l	1,11	58	5,8
Pc L12V	1	1,5 l	1,1	9	6
	2	10 l	1,1	77	7,7
	3	10 l	1,05	56	5,6
Pc L12F	1	1,5 l	1,1	3	2
	2	10 l	1,32	22	2,2
	3	10 l	1,07	53	5,3
Pc E68G	1	8 l	1,2	80	8
	2	8 l	1,6	8	0,8
	3	8 l	1,2	21	2,1
Pc E68G L12G	1	1,5 l	-	-	-
	2	8 l	-	-	-
Pc E68G L12A	1	8 l	1,77	24	3
	2	10 l	1,9	10	1
	3	10 l	1,14	25	2,5
	4	10 l	1,17	41	4,1

4 Le transfert d'électron

4.1 Introduction

L'approche théorique et mathématique du transfert d'électron en général et impliquant des métalloprotéines sont présentées en détails dans la thèse de Veredo [5].

La réduction de la plastocyanine est ici considérée sous deux angles. Le premier est l'étude de la cinétique du transfert d'électrons (4.2), le second est la mesure du taux de fixation du complexe de cobalt oxydé sur la protéine réduite suite au transfert d'électrons (4.3).

4.2 Les cinétiques du transfert d'électrons

Le système étudié ici présente des vitesses moyennes, les demi-vies se situent entre 5 et 15 minutes. Ces réactions sont suffisamment lentes pour pouvoir être suivies en utilisant un spectrophotomètre ordinaire en mesurant la variation de l'absorbance à 597nm. Dans les conditions expérimentales, la plastocyanine oxydée est la seule composante du mélange réactionnel qui absorbe de façon significative à cette longueur d'onde (Fig. 38 et 39).

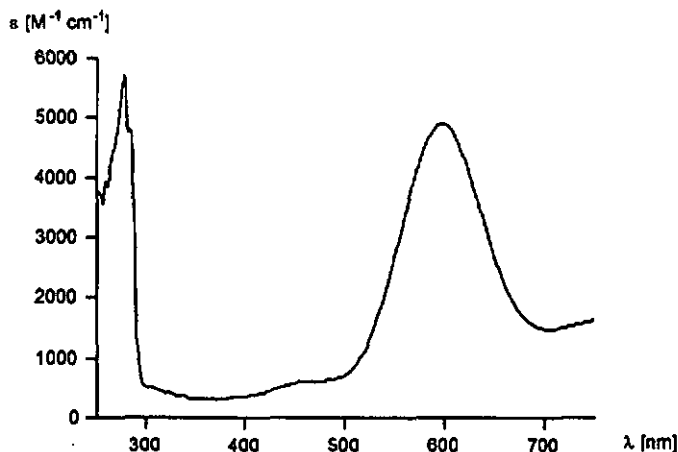


Fig. 38: Spectra UV/Vis de la plastocyanine oxydée.

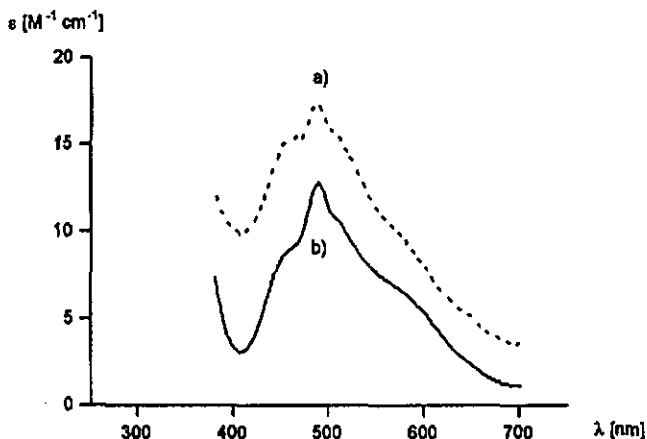


Fig. 39: Spectre UV/Vis de a) l'aqua-complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ et b) l'aqua-complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$.

Toutes les mesures cinétiques de réduction de la plastocyanine sont réalisées dans des conditions de pseudo-premier ordre, la concentration en complexe étant au minimum 20 fois supérieure à celle de la protéine. La loi de vitesse se ramène ainsi à :

$$v = -d[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]/dt = k_{\text{red}} \cdot [\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})] \cdot [\text{complexe}] = k_{\text{obs}} \cdot [\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]$$

Après intégration :

$$\ln[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]_t = \ln[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]_0 - k_{\text{obs}} \cdot t$$

et donc :

$$[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]_t = [\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]_0 \cdot \exp^{-(k_{\text{obs}} \cdot t)}$$

La constante de vitesse k_{obs} est déterminée avec le logiciel d'approximation de fonction KALEIDAGRAPH. Il permet de calculer les paramètres correspondant au mieux à une fonction mathématique donnée $Y = F(X)$. Dans nos mesures, $[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]_t$ est proportionnelle à l'absorption mesurée à 597nm $E_t - E_{\text{ref}}$ et $[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})]_0$ proportionnelle à $E_0 - E_{\text{ref}}$ (Fig. 40). Pour l'analyse d'une réaction de pseudo-premier ordre, la fonction utilisée par KALEIDAGRAPH est donc :

$$Y = (E_0 - E_{inf}) \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) + E_{inf}$$

Le constante bimoléculaire k_{et} est alors égale à la constante observée divisée par la concentration en complexe initialement présente dans la cellule de mesure.

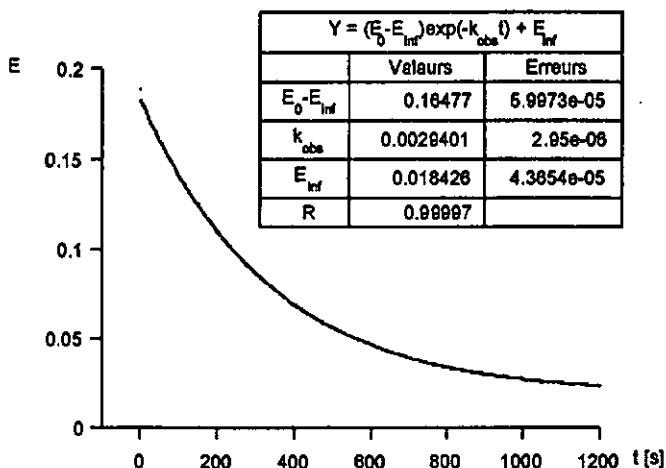


Fig. 40: Fonction exponentielle calculée par Kalaidagrapth superposée à la trace cinétique expérimentale (pointillé). Les résultats numériques de l'exemple choisi sont donnés dans l'encart.

Les mesures en fonction de la température permettant la détermination des paramètres d'activation ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger . En effet, selon la relation de Eyring, on a :

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{R \cdot T}\right)$$

k est la constante de vitesse de la réaction à la température T . ΔG^\ddagger est la différence de l'énergie d'activation entre l'état de transition et l'état initial. R est la constante des gaz parfaits, k_B la constante de Boltzmann et h la constante de Planck. En introduisant l'équation $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ dans la relation de Eyring, on obtient la relation (2) qui relie la constante de vitesse k de réaction à l'enthalpie d'activation ΔH^\ddagger et à l'entropie d'activation ΔS^\ddagger .

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{R \cdot T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \quad (2)$$

Cette relation, établie pour des réactions en phase gazeuse est couramment utilisée pour les réactions en solution.

Les paramètres d'activation peuvent se déduire par régression linéaire de la représentation $\ln(k/T) = f(1/T)$. La valeur de ΔS^\ddagger , vue le faible domaine de température accessible, est alors souvent entachée d'une grande imprécision, car elle est obtenue par l'extrapolation de la représentation de Eyring à $1/T$ égale à 0. La valeur de ΔH^\ddagger est obtenue à partir de la pente de cette même régression linéaire.

4.2.1 Solutions de mesures

Toutes les mesures de TE sont effectuées dans un tampon 0,1M phosphate à pH 7.0, préparé par pesée de Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 (purum p.a. ou qualité supérieure) et dissout dans de l'eau bidistillée dégazée. Les solutions de complexe ont une concentration de l'ordre de 10^{-5} M. Elles sont préparées en ajoutant 1,2 équivalent de ligand elamp ou promp à un volume précis d'une solution aqueuse de sulfate de cobalt(II), dont la concentration exacte est déterminée par titration complexométrique. Le pH est ajusté à ~7 par NaOH dilué puis le volume complété par le tampon phosphate de pH 7.0 dont la concentration permet également de fixer la force ionique.

Les solutions de complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{elamp})]$ doivent être purgées sous azote ou argon jusqu'à disparition de la coloration jaune due à la présence de complexe oxygéné [77] et maintenues constamment sous atmosphère inerte. Pour éviter toute contamination par l'oxygène, les manipulations de ces solutions ont lieu dans un sac à gants sous azote.

Les solutions de complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ ne forment pas de produits d'addition avec l'oxygène.

La solution de plastocyanine est préparée à partir d'un échantillon concentré en le diluant à une concentration de l'ordre de 10^{-5} M avec le tampon phosphate 0,1M à pH 7.0. Pour les mesures avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{elamp})]$, la solution de protéine est préalablement dégazée sous vide et maintenue sous atmosphère inerte pour éviter l'oxygénation du complexe lors du mélange des deux solutions. La concentration de $\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})$ est déterminée par l'absorption à 597nm en utilisant une valeur de $\epsilon = 4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La qualité de l'échantillon est

contrôlé par le rapport des absorbance A_{277} / A_{697} , tout au long de la journée de mesure. Le volume des échantillons concentrés est d'ailleurs ajusté pour être utilisé en une seule journée.

La stabilité thermique de la plastocyanine n'autorise qu'un domaine relativement restreint de température d'étude. Nous avons choisit une gamme de température allant de 15° à 40°C, avec des intervalles de 5°.

Chaque série de mesures couvrant l'ensemble du domaine de température est effectuée deux fois en utilisant chaque fois des solutions fraîchement préparées et de la protéine et des complexes.

4.2.2 Réactions avec Δ -[Co^{II}](R,R)-promp] et Λ -[Co^{II}](S,S)-promp]

Les cinétiques menées en fonction de la température avec tous les mutants de la plastocyanine ont permis d'établir les valeurs des paramètres d'activation (Tableau 6) e partir des représentations de Eyring données dans les figures 41 à 47.

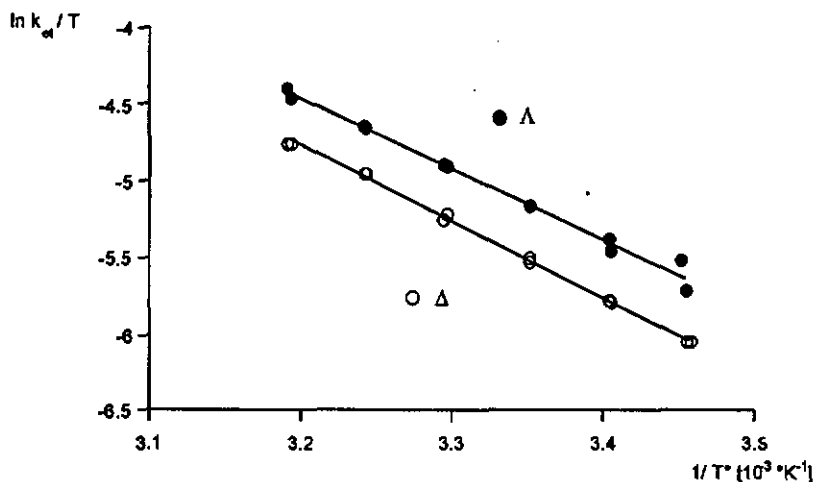


Fig. 41: Représentation de Eyring de la réduction de Pc wt per Λ -[Co^{II}](S,S)-promp] et Δ -[Co^{II}](R,R)-promp]. [Co^{II}] = 10⁻³M; [(R,R)- ou (S,S)-promp] = 1,2 · 10⁻³ M; [Pc(Cu^{II})] = 10⁻⁶M; tampon phosphate pH = 7.0; I = 0.12M.

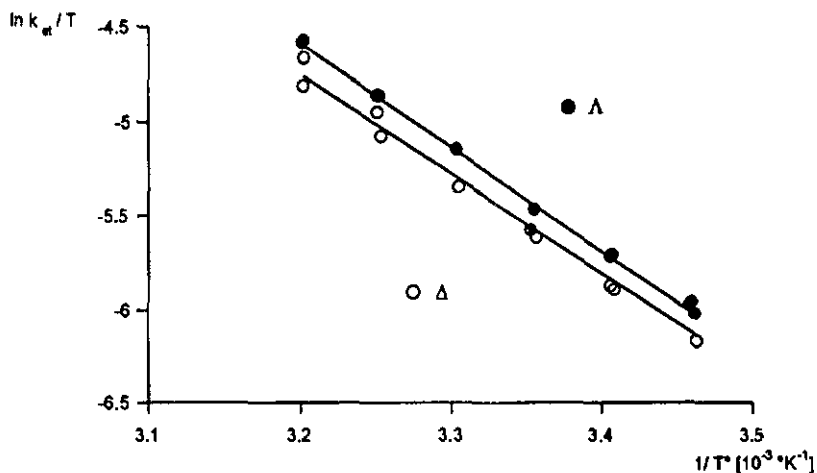


Fig. 42: Représentation de Eyring de la réduction de Pc L12G par Λ -[Co^{II}(S,S)-promp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-promp]. Conditions voir figure 41.

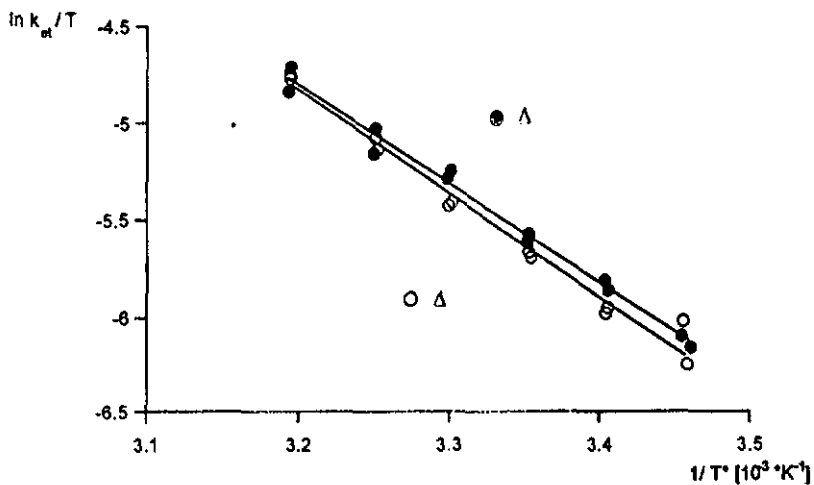


Fig. 43: Représentation de Eyring de la réduction de Pc L12A par Λ -[Co^{II}(S,S)-promp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-promp]. Conditions voir figure 41.

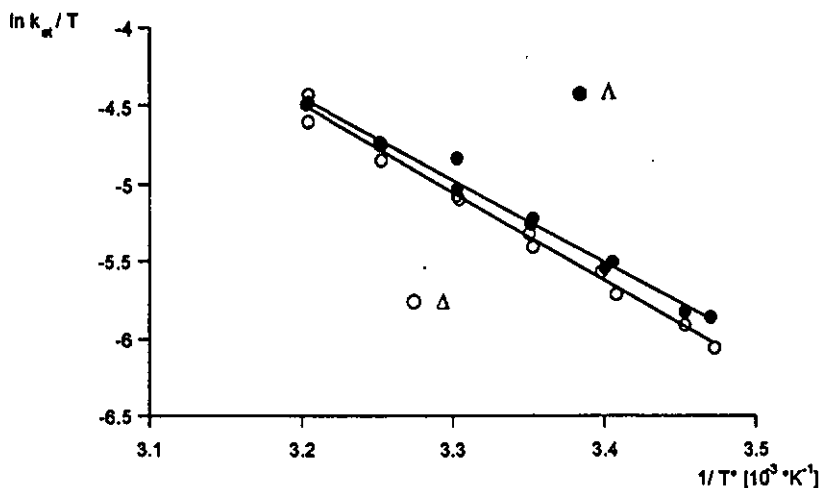


Fig. 44: Représentation de Eyring de la réduction de Pc L12V par Λ -[Co^{II}(S,S)-promp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-promp]. Conditions voir figure 41.

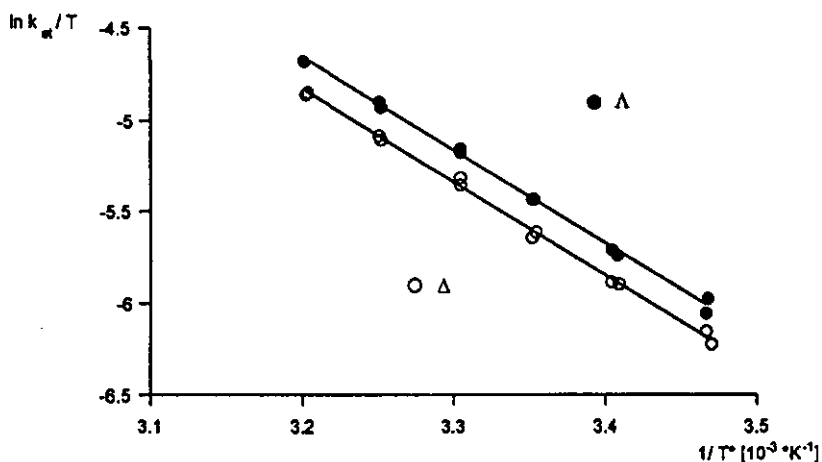


Fig. 45: Représentation de Eyring de la réduction de Pc L12F par Λ -[Co^{II}(S,S)-promp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-promp]. Conditions voir figure 41.

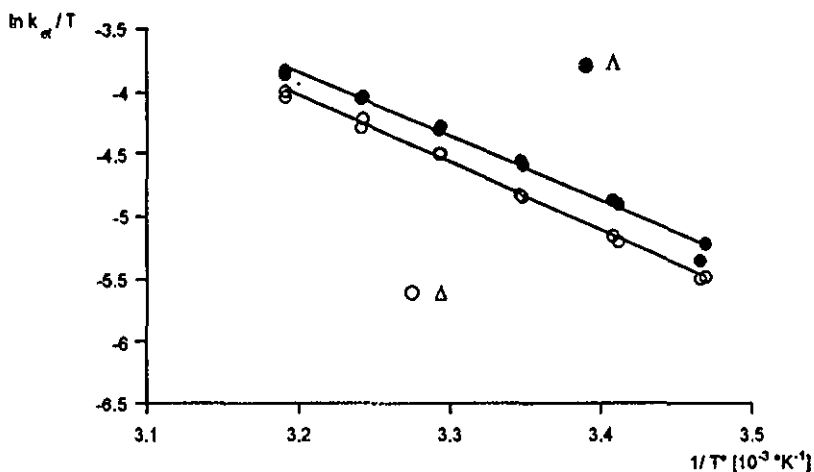


Fig. 46: Représentation de Eyring de la réduction de Pc E68G par Λ -[Co^{II}(S,S)-promp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-promp]. Conditions voir figure 41.

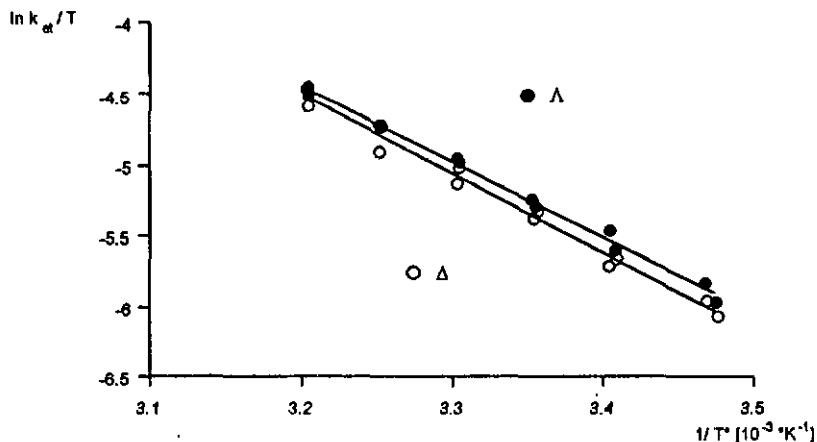


Fig. 47: Représentation de Eyring de la réduction de Pc E68G L12A par Λ -[Co^{II}(S,S)-promp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-promp]. Conditions voir figure 41.

Tableau 6: Valeurs des paramètres d'activations pour les réactions de réduction des différents mutants de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$.

protéine	énantiomère	ΔH^\ddagger [kJ mole ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J mole ⁻¹ K ⁻¹]
Pc native ¹	Δ	39.4	-111
Pc native ¹	Λ	39.7	-107
Pc wt	Δ	41.1	-106
Pc wt	Λ	38.0	-113
L12G	Δ	43.9	-97
L12G	Λ	45.7	-89
L12A	Δ	44.1	-96
L12A	Λ	42.2	-102
L12V	Δ	47.3	-83
L12V	Λ	43.7	-95
L12F	Δ	42.3	-102
L12F	Λ	42.3	-100
E68G	Δ	44.9	-87
E68G	Λ	42.8	-92
E68G L12A	Δ	46.7	-85
E68G L12A	Λ	44.2	-93

¹ Valeurs établies par Verardo dans sa thèse

Tableau 7: Tableau comparatif des constantes de vitesses moyennes k_{rel} [M⁻¹ s⁻¹] de la réduction des différents mutants de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ à ~ 25°C.

protéine	$k_{\text{rel}\Delta}$	$k_{\text{rel}\Delta}$ relatif	$k_{\text{rel}\Lambda}$	$k_{\text{rel}\Lambda}$ relatif	$k_{\text{rel}\Delta} / k_{\text{rel}\Lambda}$
Pc native ¹	1.35		1.73		
Pc wt	1.20	1	1.70	1	0.71
L12G	1.11	0.93	1.40	0.83	0.79
L12A	1.03	0.83	1.12	0.66	0.92
L12V	1.41	1.18	1.68	0.99	0.84
L12F	1.08	0.90	1.31	0.77	0.82
E68G	2.39	1.99	3.10	1.82	0.77
E68G L12A	1.22	1.02	1.55	0.91	0.79

¹ Valeurs établies par Verardo dans sa thèse

4.2.3 Discussion

Les valeurs des paramètres d'activation (Tableau 6) montrent que les mutations introduites à proximité du site actif présumé ne modifient pas de manière sensible les conditions thermodynamiques du TE. Ces valeurs se situent pour ΔH^\ddagger à environ $40 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ et pour ΔS^\ddagger à environ $-100 \text{ J} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. Les valeurs de la stéréosélectivité sont également dans le même ordre de grandeur, avec pour $\Delta\Delta H^\ddagger < 5 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$ et pour $\Delta\Delta S^\ddagger < 10 \text{ J} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ et dans le même sens, en faveur de l'énantiomère Λ . Ces valeurs sont comparables à celles de la plastocyanine native et wild type, avec toutefois la tendance d'une enthalpie d'activation légèrement plus élevée, compensée par une entropie d'activation moins négative. Ce qui tend à montrer que le TE avec $\Delta\text{-[Co}^{II}\text{(R,R)-promp]}$ et $\Lambda\text{-[Co}^{II}\text{(S,S)-promp]}$ n'a pas lieu à la toute proximité du site actif présumé ou que l'approche du complexe lors du TE n'est pas suffisante pour être influencée significativement par les mutations.

En ce qui concerne la vitesse des réactions avec $\Lambda\text{-}$ et $\Delta\text{-[Co}^{II}\text{(promp)]}$ à 25°C , les mutants L12G, L12A, L12V, L12F et E68G L12A ne montrent que de faibles variations par rapport à la Pc wt, elles sont un peu plus marquées pour l'énantiomère Λ . Seule exception, la vitesse de E68G est environ deux fois plus grande. Cette vitesse plus grande peut s'expliquer par une meilleure accessibilité au site actif. En effet les mesures de séquestration (Chapitre 5) ont montré que le site actif de ce mutant est plus facile d'accès que celui de la Pc wt. L'augmentation de l'accessibilité est un trait commun de tous les mutants, alors pourquoi ne présentent-ils pas aussi une accélération du TE? La réponse pourrait être contenue dans l'importance du résidu Leucine 12 dans le positionnement du complexe de cobalt lors de la formation de l'intermédiaire. Les interactions entre leucine 12 et le complexe de cobalt pourraient être de type hydrophobes avec le résidu cyclique de proline ou le cycle pyridine du ligand. L'exemple d'une accessibilité accrue compensée par une perte des interactions avec leucine 12 est le cas de E68G L12A.

4.2.4 Réactions avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] et Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp]

Pour les réactions de TE avec [Co^{II}(alamp)], les cinétiques avec Pc wt, L12G, L12V et L12F ont permis de déterminer les valeurs des paramètres d'activations (Tableau 8) grâce aux représentations de Eyring (figures 48 à 51).

Tableau 8: Valeurs des paramètres d'activations pour les réactions de réduction des différenciants mutants de la plastocyanine par [Co^{II}(alamp)].

protéine	énantiomère	ΔH^\ddagger [kJ mole ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J mole ⁻¹ K ⁻¹]
Pc native ¹	Δ	57.6	-50
Pc native ¹	Λ	73.7	5
Pc wt	Δ	64.0	-29
Pc wt	Λ	71.1	6
L12G	Δ	68.5	-3
L12G	Λ	78.7	31
L12V	Δ	74.9	19
L12V	Λ	80.8	35
L12F	Δ	67.2	-24
L12F	Λ	64.8	-32

¹ Valeurs établies par Verardo dans sa thèse

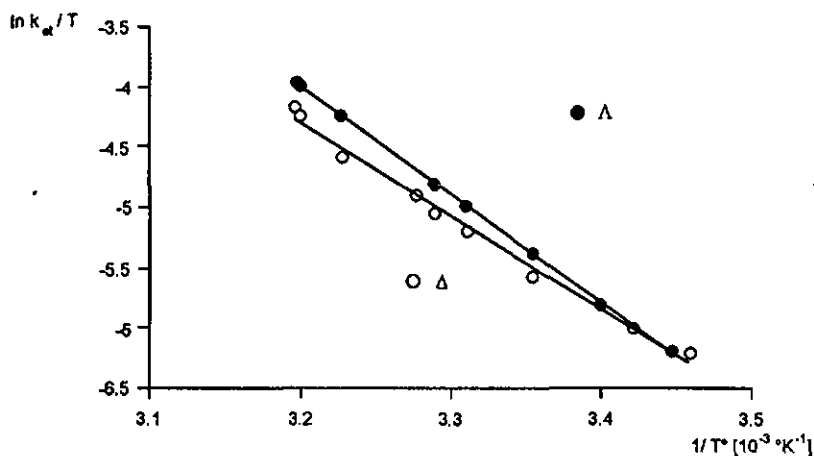


Fig. 48: Représentation de Eyring de la réduction de Pc wt par Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-elem]. [Co^{II}] = 10⁻³M; [(R,R)- ou (S,S)-alamp] = 1,2 · 10⁻³ M; [Pc(Cu^{II})] = 10⁻⁶M; tempon phosphate pH = 7,0; I = 0.12M

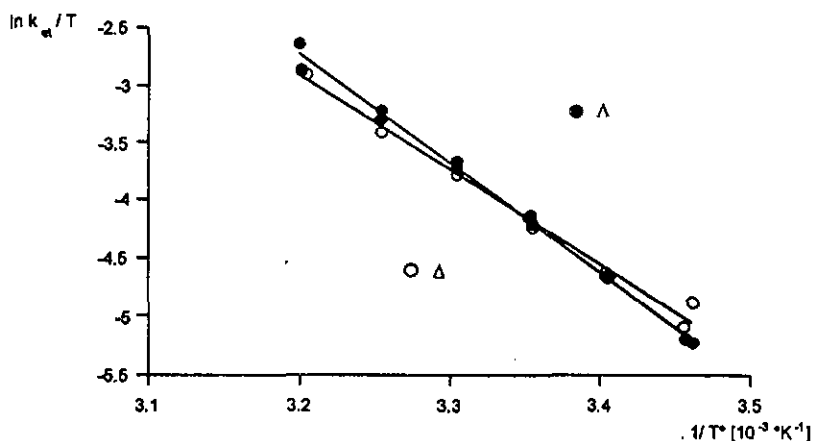


Fig. 49: Représentation de Eyring de la réduction de Pc L12G par Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp]. Conditions voir figure 48.

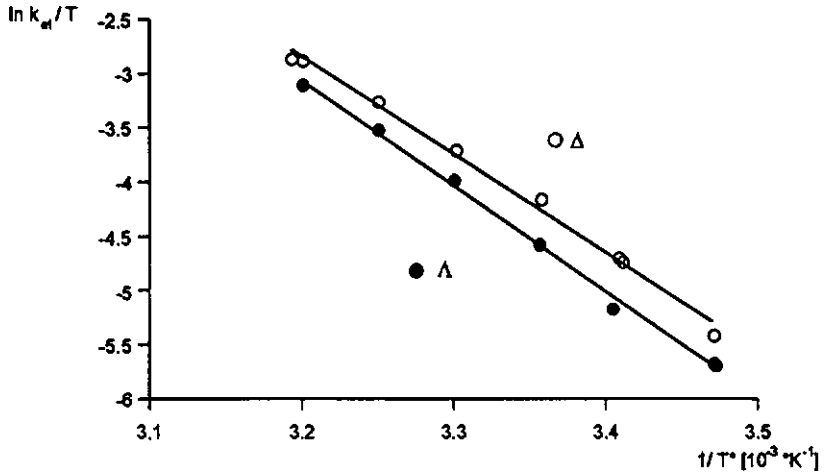


Fig. 50: Représentation de Eyring de la réduction de Pc L12V par Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp]. Conditions voir figure 48.

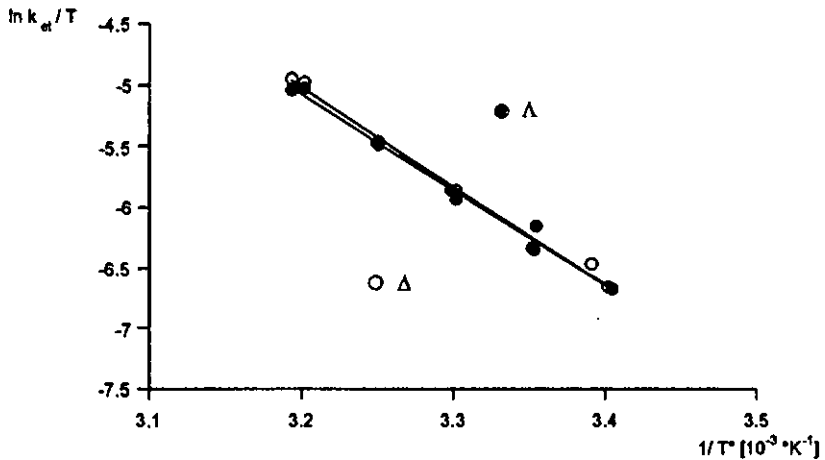


Fig. 51: Représentation de Eyring de la réduction de Pc L12F par Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp]. Conditions voir figure 48.

Les mutants L12A, E68G et E68G L12A montrent un comportement tout à fait surprenant. D'une part, les réactions de ces mutants avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ montrent des cinétiques biphasiques et d'autre part, la différence entre les deux énantiomères est extraordinairement plus grande dans la deuxième phase et opposée à celle de la première. Vu le fait que ces observations sont absolument inattendues, les expériences avec le mutant L12A ont été effectuées avec quatre préparations de protéines différentes et espacées de plus d'une année. Les résultats sont parfaitement reproductibles.

Les figures suivantes représentent ces cinétiques à 25°C.

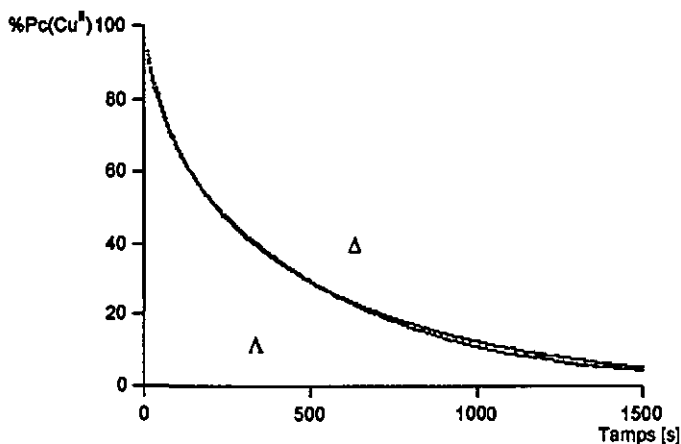


Fig. 52: Traces cinétiques de la réduction de Pc E68G par Λ - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{S,S})\text{-alamp}]$ et Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$ à 25°C. $[\text{Co}^{\text{II}}] = 10^{-3}\text{M}$; $[(\text{R,R})\text{- ou } (\text{S,S})\text{-alamp}] = 1,2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ $[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})] = 10^{-5}\text{M}$; tampon phosphate pH = 7.0; $I = 0.12\text{M}$.

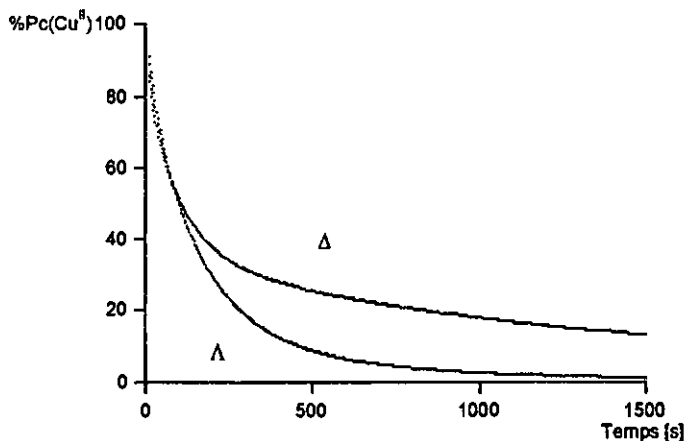


Fig. 53: Traces cinétiques de la réduction de Pc L12A par Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] à 25°C. Conditions voir figure 52.

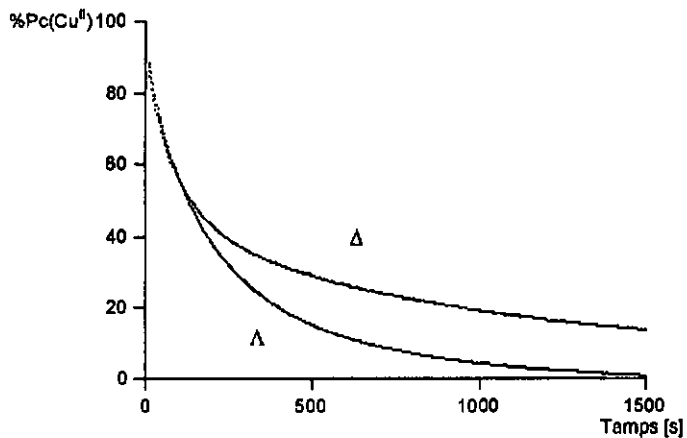


Fig. 54: Traces cinétiques de la réduction de Pc E68G L12A par Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] à 25°C. Conditions voir figure 52.

Le suivi de la réaction de Pc L12A avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alemp] ne permet pas de détecter un intermédiaire ayant un spectre d'absorption différent (Fig. 55).

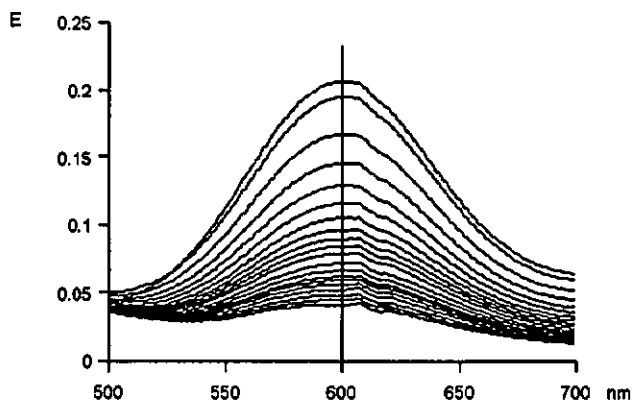
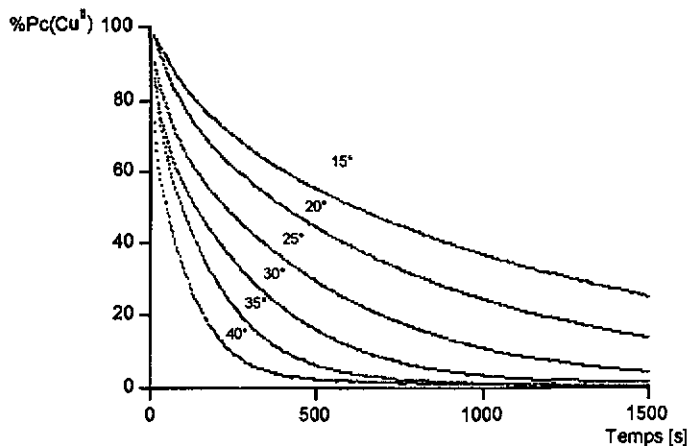


Fig. 55: Evolution du spectre d'absorption de Pc L12A lors de la réaction avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alemp]. $\Delta t = 1$ min., autres conditions comme indiquées dans le figure 52.

Pour les trois mutants montrant ce comportement particulier et représenté dans les figures 52 à 54, les réactions ont également été mesurées en fonction de la température. Pour faciliter la comparaison et la discussion ces mesures sont groupées dans les figures 56 à 58, séparément pour chaque énantiomère et pour chaque mutant.

e)



b)

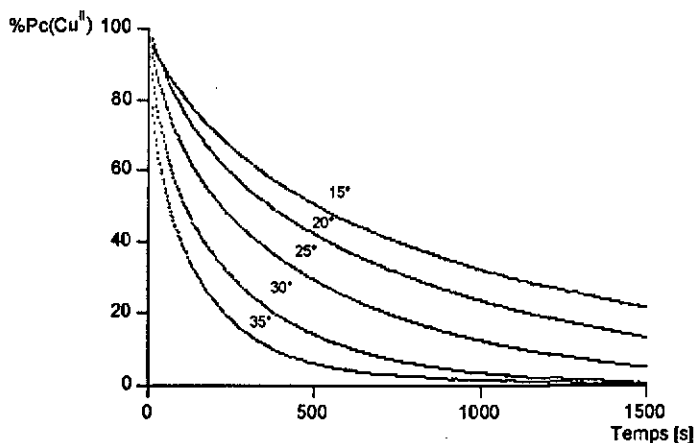
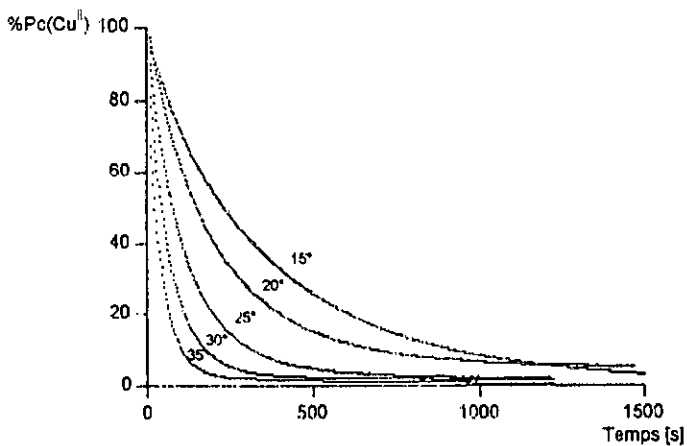


Fig. 56: Traces cinétiques de la réduction de Pc E68G par a) Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et b) Δ -[Co^{II}(R,R)-elamp] en fonction de la température. Autres conditions comme indiquées dans la figure 52.

a)



b)

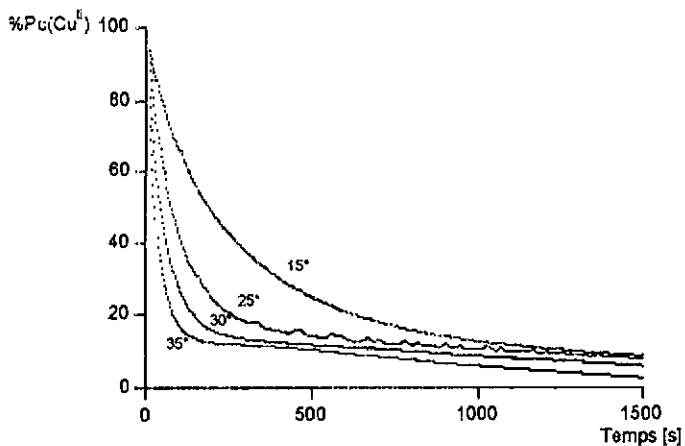


Fig. 57: Traces cinétiques de la réduction de Pc L12A par a) $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{S,S})\text{-elamp}]$ et b) $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$ en fonction de la température. Autres conditions comme indiquées dans la figure 52.

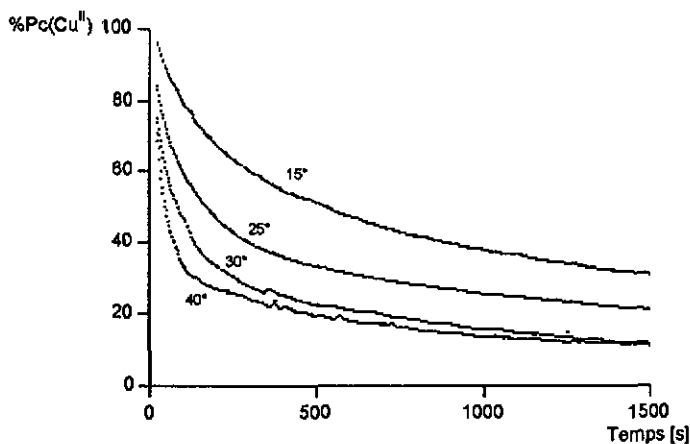
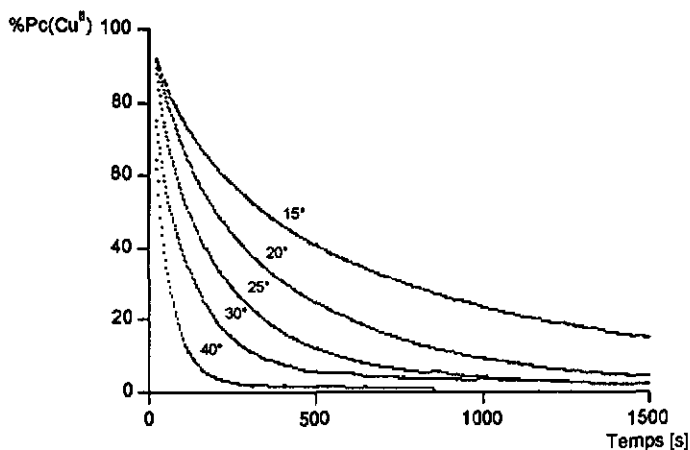


Fig. 58: Traces cinétiques de la réduction de Pc E68G L12A par a) Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et b) Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] en fonction de la température. Autres conditions comme indiquées dans la figure 52.

Les constantes de vitesse des réactions de TE entre $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{elamp})]$ et l'ensemble des plastocyanines recombinantes sont réunies dans le tableau 9. Les valeurs des mutants montrant un comportement biphasique ne concernent que la première phase. Dans ces cas, les constantes de vitesse sont déterminées à l'aide de la vitesse initiale V_0 en supposant que la concentration de protéine réagissant à cette vitesse soit égale à la concentration totale. En plus des valeurs de stéréosélectivité ($k_{\text{d}} / k_{\text{A}}$), le tableau contient également une comparaison des vitesses de chacun des mutants par rapport à la protéine wild type.

Tableau 9: Tableau comparatif des constantes de vitesses moyennes k_{et} [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] de la réduction de différents mutants de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ à $\sim 25^\circ\text{C}$.

protéine	k_{etA}	k_{etA} relatif	k_{etL}	k_{etL} relatif	$k_{\text{etA}} / k_{\text{etL}}$
Pc native ¹	1.17		1.39		
Pc wt	1.14	1	1.38	1	0.83
L12G	4.5	3.95	4.6	3.33	0.98
L12A	10.2*	8.95*	6.9*	5.0*	1.48*
L12V	4.6	4.04	3.1	2.25	1.48
L12F	0.53	0.46	0.53	0.38	1
E68G	4.0*	3.51*	3.8*	2.75*	1.05*
E68G L12A	9.3*	8.16*	6.0*	4.35*	1.55*

*Indique les cinétiques biphasiques, pour lesquelles k_{et} est établie sur la partie initiale de la cinétique.

¹Valeurs établies par Verardo dans sa thèse.

4.2.5 Discussion

Si les réactions entre les différentes formes de plastocyanine (native et recombinante) et $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ sont très semblables (cf. 4.2.2) aussi bien en ce qui concerne les constantes de vitesse - et en conséquence la stéréosélectivité - que les paramètres d'activation, ce n'est plus le cas pour $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$. En effet, des différences importantes sont observées à plusieurs niveaux. Le signification du comportement particulier observé pour les protéines mutantes est encore soulignée par le fait que les vitesses réactionnelles à 25°C des protéines native et wild type, déterminées de manière indépendante et à des

moments différents, sont parfaitement les mêmes. Si une légère différence s'observe pour l'isomère Δ dans les paramètres d'activation, elle peut être attribuée à l'imprécision de la mesure à 40°C. En effet, en ne considérant pour Pc wt que les mesures entre 15 et 35°C (cf. Fig 48), qui s'alignent correctement sur une droite, des valeurs de $\Delta H^\ddagger = 59.5 \text{ kJ}^{-1}$ et $\Delta S^\ddagger = -43 \text{ J K}^{-1} \text{ mole}^{-1}$, sont obtenues. Ces valeurs correspondent dans les limites d'erreur à celles obtenues pour Pc nt dans le même domaine de température (Tableau 8).

Parmi les plastocyanines présentant une cinétique de premier ordre, une stéréosélectivité significative à 25°C est observée pour Pc nt, Pc wt et Pc L12V, cependant la stéréosélectivité est faible pour L12G et inexistante pour L12F. Il faut pourtant relativiser ces valeurs étant donné qu'elles se composent de deux contributions: ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger . Leur contribution relative à ΔG^\ddagger peut varier et provoquer ainsi même une inversion de la stéréosélectivité. L'interprétation d'une telle inversion n'est donc possible qu'en connaissant les différences de chacune des contributions séparément. Ceci est indiqué dans le tableau 10.

Tableau 10: Valeurs des différences entre les paramètres d'activation, pour les deux énantiomères Δ et Λ à $T = 25^\circ\text{C}$.

Protéines:	$\Delta\Delta H^\ddagger_{\Delta-\Lambda}$	$T \cdot \Delta\Delta S^\ddagger_{\Delta-\Lambda}$	$\Delta\Delta G^\ddagger_{\Delta-\Lambda}$
Pc nt	-16.1	-16.4	+0.3
Pc wt	-11.6	-14.7	+3.1
Pc L12V	-5.9	-4.8	-1.1
Pc L12G	-10.2	-10.16	-0.04
Pc L12F	+2.44	+2.38	0.0

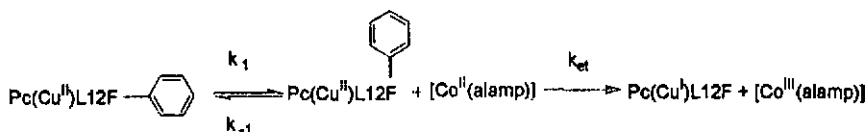
Ce qui est important, c'est que le signe de $\Delta\Delta H^\ddagger$ et de $\Delta\Delta S^\ddagger$ (défini par convention comme $\Delta H^\ddagger_{\Delta} - \Delta H^\ddagger_{\Lambda}$ et $\Delta S^\ddagger_{\Delta} - \Delta S^\ddagger_{\Lambda}$) soit le même pour les quatre premières plastocyanines. Ainsi la stéréosélectivité de L12G est très faible à 25°C car le croisement des droites de Eyring se trouve tout près de cette température.

En comparant les valeurs des constantes de vitesse de tous les mutants à celles de Pc nt et Pc wt, on constate que - à l'exception de L12F - tous réagissent pour l'isomère Δ 4 à 9

fois et pour l'isomère A 2 à 5 fois plus rapidement. Ceci en ne considérant que la première phase dans les cas pour lesquels une réaction biphasique est observée. Cette accélération pourrait être la conséquence d'une meilleure accessibilité au site réactionnel, due vraisemblablement à l'action conjuguée de plusieurs effets, dont une variation de l'encombrement stérique et de la rigidité structurale des protéines. L'hypothèse d'une meilleure accessibilité au site réactionnel est soutenue par les mesures de fixation sur le centre métallique, suite au TE et de la séquestration du Cu^{2+} , mesures décrites dans les chapitres 4.3 et 5 respectivement.

Le cas de L12F demande à être discuté séparément. En effet, deux observations le distinguent de tous les autres: d'une part la vitesse réactionnelle à 25°C est plus de deux fois inférieure à celle de Pc nt et d'autre part on n'observe plus de stéréosélectivité cinétique sur l'ensemble du domaine de température (voir Fig.51; les différences des valeurs calculées, données dans le tableau 10 se trouvent dans les limites d'erreur). Ces observations suggèrent que l'étape déterminant la vitesse globale n'est pas la réaction de TE. L'hypothèse la plus probable est que la protéine est présente principalement sous une forme non réactive, étant donné la position du cycle aromatique de phénylalanine. La vitesse réactionnelle serait ainsi déterminée par la vitesse de formation d'une forme réactive par un changement de conformation selon l'équation 1.

Equation 1



En appliquant l'approche de l'état stationnaire ($d[B]/dt = 0$; B = forme active), valable pour autant que la concentration de la forme active soit toujours petite ($k_1 \ll k_{-1}$), la loi cinétique s'exprime sous la forme suivante:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{k_1 \cdot k_{\text{et}} [C][A]}{k_{-1} + k_{\text{et}} [C]}$$

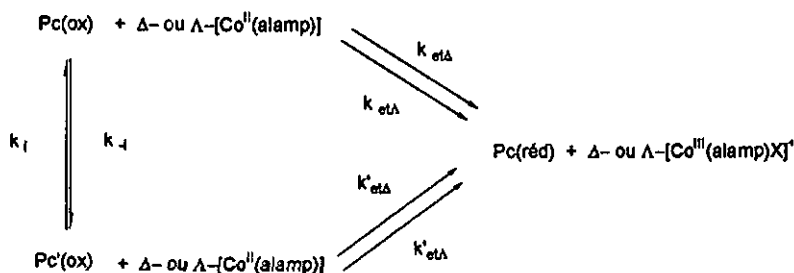
A = forme non active; C = complexe

Si en plus $k_{-1} \ll k_{tr}[C]$, la loi cinétique se réduit à :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k_1[A]$$

Ce qui explique l'absence de stéréosélectivité puisque la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration du réactif optiquement actif.

Une dernière observation marquante. Contrairement à ce que l'on observe dans les réactions avec $[Co^{II}(\text{promp})]$ et $[Co^{II}(\text{alamp})]$ vis-à-vis de $Pc\ nt$ et $Pc\ wt$, certains mutants présentent des cinétiques biphasiques. Il s'agit des réactions de L12A, E68G et E68G L12A avec les deux énantiomères de $[Co^{II}(\text{alamp})]$ (Fig. 52 à 54). Un tel comportement suggère la présence de deux formes interconvertibles de plastocyanine réagissant à des vitesses différentes. De plus chaque énantiomère du complexe peut montrer une réactivité différente envers l'une ou l'autre des deux formes. Les systèmes sont ainsi représentés par le schéma réactionnel suivant :



*) Pour la définition de X voir chapitre 4.3.

Schéma 1

L'apparition et l'importance du comportement biphasique dépend des valeurs relatives des constantes d'isomérisation (k_1 et k_{-1}) et des différentes constantes de transfert d'électrons. Ce comportement biphasique est observé pour la première fois avec le mutant E68G. Dans ce cas, la différence entre les deux énantiomères est faible mais visible (Fig. 52), avec un minimum à 25°C, c'est-à-dire proche de la température du croisement des droites de Eyring pour $Pc\ nt$ ou $Pc\ wt$. La différence entre les deux énantiomères devient cependant dramatique, lorsque l'acide aminé leucine 12 est remplacé par alanine. En effet, avec les mutants L12A et E68G L12A, la réaction avec l'énantiomère Λ correspond à une réaction monophasique, alors que la réaction avec

l'énantiomère Δ est légèrement plus rapide dans une première phase (k_d et $k_A = 1.48$ resp. 1.55; voir tableau 9) pour ralentir très fortement après 50% de réaction (Fig. 53 et 54). Basée sur le schéma 1, les conclusions suivantes s'imposent:

a) Le comportement de l'énantiomère Δ n'est possible que si l'interconversion entre les deux formes de plastocyanine est lente.

b) Vue la condition sous e) l'énantiomère Λ réagit avec les deux formes de plastocyanine à des vitesses comparables.

c) Le ralentissement de la réaction avec l'énantiomère Δ dans la deuxième phase peut s'expliquer de deux façons:

- Si la réaction d'isomérisation est plus rapide que le TE avec l'une des deux formes, c'est la réaction d'isomérisation qui est limitante pour la vitesse de la deuxième phase. Toute la réaction de TE se déroule alors via une seule forme de la protéine.

- Si la réaction d'isomérisation est plus lente que le TE avec l'une et l'autre des deux formes, c'est le TE qui est alors limitant pour la vitesse des deux phases.

Sur la base des informations données jusqu'à ce point, il n'est pas possible de distinguer ces deux façons. Néanmoins, la vitesse de la deuxième phase de la réaction avec Δ -[Co^{II}(R,R)-elamp] ne dépendant peu ou pas de la température (Fig. 56 à 58), on peut pencher pour une limitation par la réaction d'isomérisation.

Des informations supplémentaires, permettant d'approfondir cette question, ont été obtenues par les mesures de fixation du centre métallique suite au TE. Ces mesures sont décrites dans le chapitre suivant.

4.3 Fixation des complexes de Co^{III} pendant le transfert d'électron

Dans l'étude des mécanismes réactionnels de TE, l'utilisation de Cr^{3+} a permis l'identification de mécanismes de type sphère interne. Pendant le TE l'aqua-ion labile de Cr^{3+} se transforme en une espèce inerte de Cr^{3+} et reste ainsi attaché au groupe ayant servi de pont pour le TE [78]. Si cette technique est utilisée pour des réactions faisant intervenir des métalloprotéines, l'identification du résidu lié au Cr^{3+} nécessite un difficile séquençage du polypeptide [79,80]. Une nouvelle technique récemment développée utilisant des complexes optiquement actifs [81] permet une analyse directe et non destructive par dichroïsme circulaire (CD).

La plastocyanine réduite n'ayant pas d'activité CD dans le domaine visible (Fig. 9), le spectre CD du complexe inerte de Co^{III} formé suite au TE peut se trouver facilement. Si le TE est de type sphère interne via le cycle imidazole de l'His87, ce cycle sera coordonné au complexe de Co^{III} . L'hydrolyse successive est suffisamment lente pour permettre une détermination quantitative du taux de fixation [5]. Si le mécanisme est de sphère externe, le complexe de Co^{III} ne se fixe pas à la protéine, une molécule d'eau occupe alors la 6^{ème} position. De plus, Verardo a montré qu'aucune fixation subséquente au TE n'a lieu. Les spectres CD relativement différents de l'aqua-complexe et de l'histidino-complexe (Fig. 59 et 60) permettent d'obtenir de précieuses informations sur les sites de la réaction.

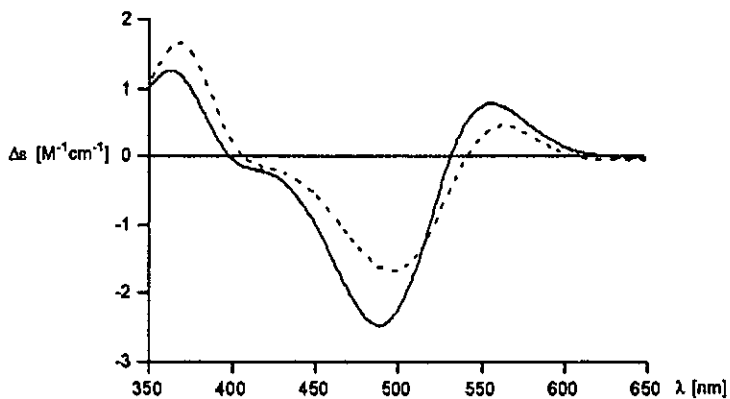


Fig. 59: Spectres CD de Δ -[Co^{III}((R,R)-promp)-H₂O]⁺ (----) et de Δ -[Co^{III}((R,R)-promp)L-his]⁺ (—).

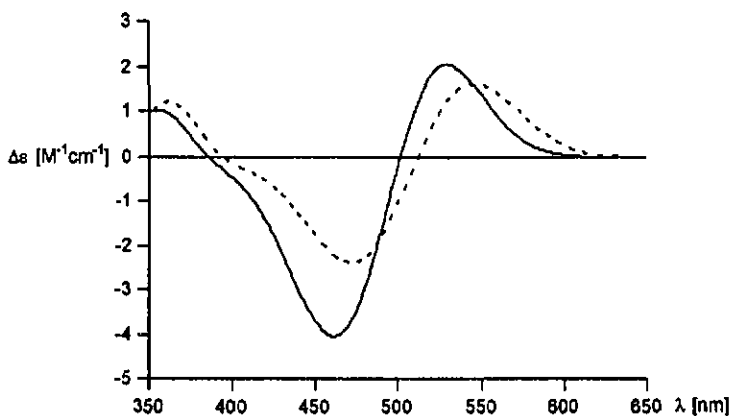


Fig. 60: Spectres CD de Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp)-H₂O]⁺ (----) et de Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp)L-his]⁺ (—).

Les solutions de plastocyanine et de complexes sont préparées comme pour les mesures de TE (4.2.1). La concentration en plastocyanine dans la cellule de mesure est de l'ordre de 10^{-4} M et celle en complexe de $2 \cdot 10^{-3}$ M. Toutes les mesures ont été effectuées à 25°C et dans un tampon phosphate 0,1M à pH 7.

Des volumes équivalents d'une solution de plastocyanine et de complexe sont mélangés dans une cuve spectropolarimétrique de 2 cm thermostatisée. Les spectres CD de 350 à 650nm sont enregistrés à des intervalles de temps réguliers. Lorsque la réaction est terminée, un spectre final est enregistré de 350 à 650nm en 3 accumulations et corrigé en soustrayant la contribution de l'excès de l'aqua-complexe de Co^{II} . Cette contribution est calculée en connaissant les concentrations initiales précises en $\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})$ et en complexe réducteur. Le spectre CD résiduel ainsi déterminé correspond au complexe de Co^{III} total formé lors du TE. Suivant les cas ce spectre est la somme du signal de l'aqua-complexe et de l'histidino-complexe de Co^{III} . La détermination de la part du signal dû à l'histidino-complexe donne le taux de fixation. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre 2 litres de tampon phosphate 0,1M à pH 7.0 (1 litre/ml de mélange). Seule la partie fixée à la protéine du complexe de Co^{III} est retenue. Le spectre CD du dialysat est alors dû au seul histidino-complexe, l'analyse de l'amplitude du signal donne une deuxième mesure du taux de fixation.

4.3.1 Essais de fixation avec Δ -[Co^{II} (R,R)-promp] et Δ -[Co^{II} (S,S)-promp]

Pour tous les mutants étudiés, les résultats sont identiques et égaux aux résultats avec la Pc nt. A pH 7 et 25°C, aucun des deux énantiomères ne se fixe à l'His 87. En effet, le spectre CD résiduel correspond à celui de l'aqua-complexe de Co^{III} et se confond avec la ligne de base après la dialyse (Fig. 61 et 62).

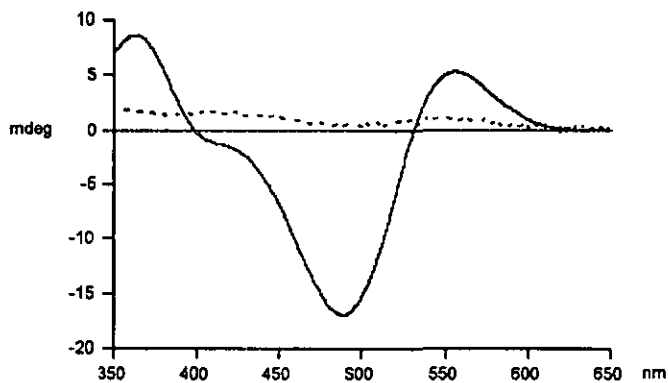


Fig. 61: Spectre CD de la solution réactionnelle de Pc L12G avec Δ -[Co^{II}(R,R)-promp] après dialyse (----) et spectre de référence de Δ -[Co^{III}((R,R)-promp)-H₂O]⁺ correspondant à 100% de la concentration initiale de plastocyanine (—).

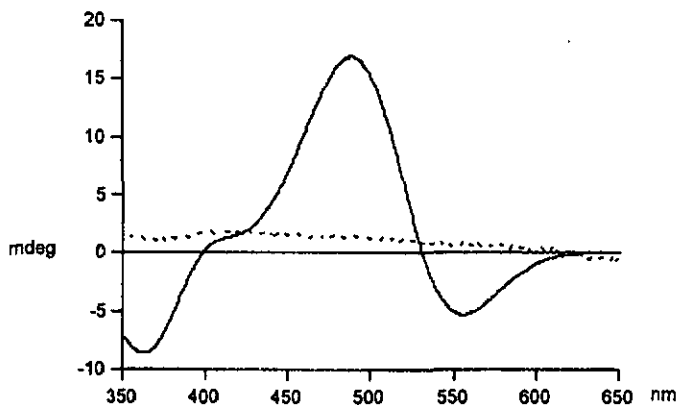


Fig. 62: Spectre CD de la solution réactionnelle de Pc L12G avec Λ -[Co^{II}(S,S)-promp] après dialyse (----) et spectre de référence de Λ -[Co^{III}((S,S)-promp)-H₂O]⁺ correspondant à 100% de la concentration initiale de plastocyanine (—).

Les résultats montrent que la TE n'a pas lieu via l'histidine 87. Tout du moins pas par association directe du complexe avec l'azote de l'imidazole de l'histidine 87 et cela pour tous les mutants étudiés.

4.3.2 Essais de fixation avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] et Δ -[Co^{II}(S,S)-alamp]

Les résultats obtenus avec Δ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et les différents mutants de la plastocyanine sont aux erreurs de mesures près égaux, à 25°C et à un pH de 7. L'énantiomère Δ se fixe quantitativement à la plastocyanine (Tableau 11). Les figures 62 et 63 illustrant, à titre d'exemple, le cas de L12F. Étant donné que le calcul de l'intensité précise du spectre résiduel est difficile, l'interprétation de ce spectre (Fig. 62) est basée sur les intersections avec la ligne de base et les positions des maxima. Par contre dans les cas des spectres après dialyse, en plus de la forme du spectre, c'est l'intensité relative qui est le critère pour le calcul du taux de fixation.

Tableau 11: Valeurs des taux de fixation (%) du complexe de Co^{III} suite à la réduction de différents mutants de la plastocyanine par Δ [Co^{II}(alamp)H₂O].

protéine	essai n°	selon la résiduel (an %)	selon le dialysé (an %)
Pc wt	1	~100	80
	2	~100	74
	3	~100	86
	4	~100	101
L12G	1	~100	117
	2	~100	97
L12A	1	~100	82
	2	~100	83
L12V	1	~100	97
L12F	1	~100	99
	2	~100	94
E68G	1	~100	110
	2	~100	83
E68G L12A	1	~100	99
	2	~100	89

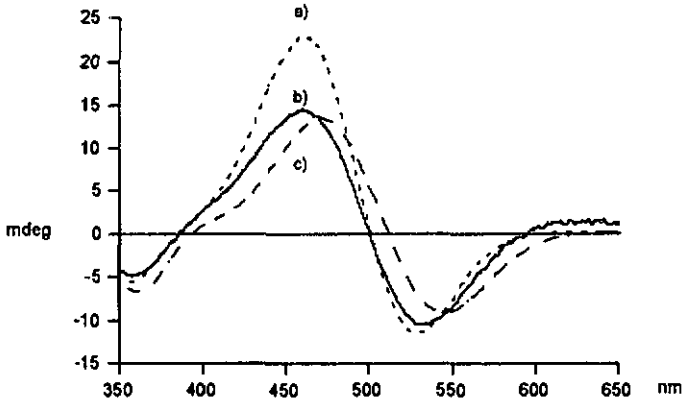


Fig. 63: Superposition du spectre CD résiduel de la réduction de la Pc L12F par Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] b) aux spectras de référence de Λ -[Co^{III}((S,S)-alamp)L-his]⁺ a) et de Λ -[Co^{III}((S,S)-elamp)-H₂O]⁺ c) correspondant à 100% de la concentration initiale en plastocyanine.

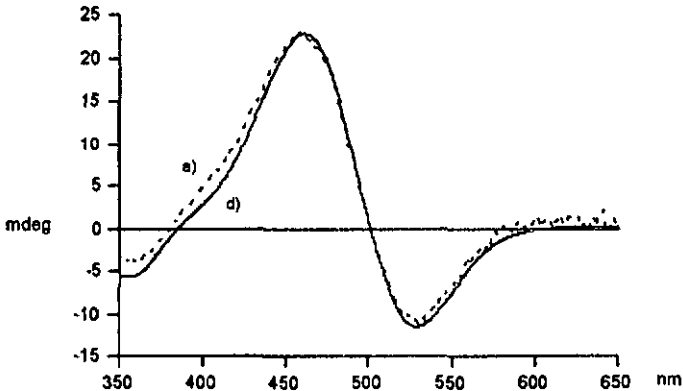


Fig. 64: Superposition du spectras CD après dialyse de la réduction de Pc L12F avec Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] d) et au spectras de référence de Λ -[Co^{III}((S,S)-alamp) L-his]⁺ correspondant à 100% de la concentration initiale de plastocyanine a).

Les mesures avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] montre des taux de fixation qui varient avec les mutations (Tableau 12).

Tableau 12: Valeurs des taux de fixation (%) du complexe de Co(III) suite à la réduction de différents mutants de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp].

protéine	essai n°	selon le résiduel (en %)	selon le dialysé (en %)
Pc wt	1	50	55
	2	50	54
L12G	1	~100	100
	2	~100	98
L12A	1	75	67
	2	75	81
L12V	1	60	59
L12F	1	70	69
	2	60	66
E68G	1	80	81
	2	80	84
E68G L12A	1	80	87
	2	80	83

Le premier essai avec Pc L12F est représentatif de ces résultats (Fig. 65 et 66).

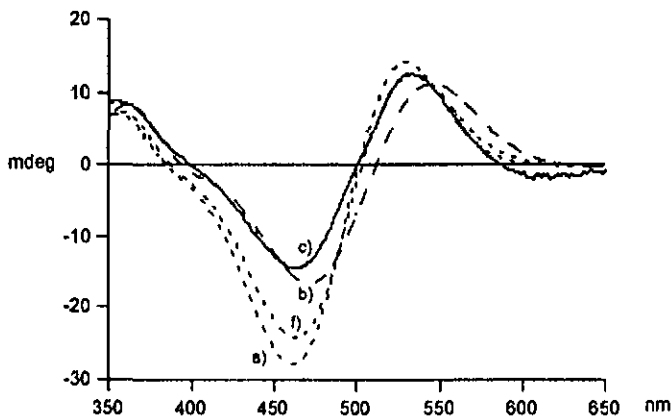


Fig. 65: Superposition du spectre CD résiduel de la réduction de la Pc L12F par Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] c) aux spectres de référence de Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp) L-his]⁺ a) et de Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp)-H₂O]⁺ b) correspondant à 100% de la concentration initiale de la plastocyanine. La fit f) correspond à 70% du signal a) et 30% du signal b).

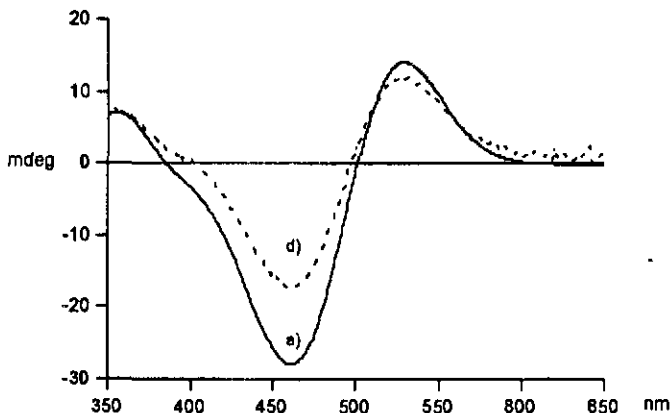


Fig. 66: Superposition du spectre CD après dialyse de la réduction de Pc L12F avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] d) et au spectre de référence de Δ -[Co^{III}((S,S)-alamp) L-his]⁺ e) correspondant à 100% de la concentration initiale de la plastocyanine a).

4.3.3 Discussion

L'ensemble des résultats donnés dans ce chapitre - en y incluant également ceux obtenus par Verardo pour Pc nt - montrent qu'au moins deux sites pour le TE doivent exister dans la partie hydrophobe (adjacent site) de la plastocyanine. Un de ces sites fait intervenir l'histidine 87, identifié par la formation de complexes binucléaires: Δ - ou Λ -[Co^{III}(alamp)-Pc(Cu^I)], alors que le(s) autre(s) site(s) ne peut(vent) pas être localisé(s) avec précision.

Alors qu'aucune fixation n'a été observée pour les complexes de promp, Λ -[Co^{III}(S,S)-alamp] est attaché quantitativement à la protéine native selon le schéma donné dans la figure 67 et, selon toute vraisemblance, également pour Pc wt et l'ensemble des mutants.

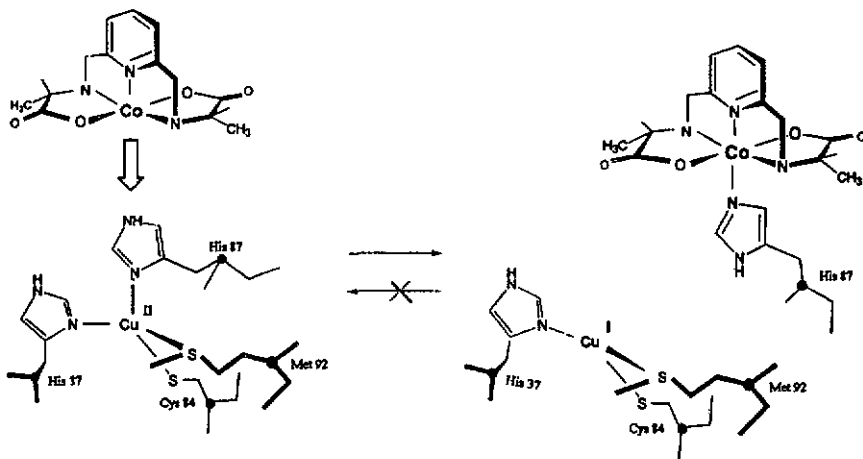


Fig. 67: Schéma du mécanisme possible de réduction de Pc(Cu^{II}) par [Co^{III}(alamp)].

Les réactions avec l'énantiomère Δ par contre ont lieu sur plusieurs sites et les résultats avec les mutants montrent que l'accessibilité au site de TE via l'His 87 pour l'énantiomère Δ est l'objet d'un fin contrôle par le résidu de la position 12 de la protéine. En effet, à la réduction de la taille de ce résidu correspond une augmentation des taux de fixation de l'énantiomère Δ . Le résultat avec L12G est cohérent avec les cinétiques de TE, la grande accessibilité au site ne permet plus une distinction significative entre les énantiomères, les deux se fixent quantitativement. Avec L12A et L12V les taux de fixation de 75 resp. 60% se situent entre celui de L12G et la protéine wild type et traduisent ainsi l'encombrement stérique relatif des résidus. Le cas de L12F est intéressant puisque la vitesse de la réaction est contrôlée par un changement de position du cycle aromatique,

conduisant à une forme active de la protéine. Cette dernière réagit ensuite d'une manière similaire à Pc wt, avec 100% de fixation pour l'énantiomère Λ et de 65% seulement pour l'énantiomère Δ . Ceci indique que dans la forme non-active de ce mutant, le résidu phénylalanine ralentit la réaction avec l'ensemble des sites utilisés par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ mais pas la réaction avec celui (ou ceux) utilisé(s) par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$.

Ce n'est pas seulement la position 12 qui est responsable de la sélection au site His 87 d'autres parties de la protéine peuvent être impliquées. En effet, la modification en position 68, où une glycine remplace un glutamate, a une influence sur le taux de fixation de l'énantiomère Δ , ce taux passe de 50 à 80%, indépendamment du fait que le résidu Leu 12 soit modifié ou non.

4.3.4 Expériences d'interruption de réactions (quenching)

4.3.4.1 Introduction

Au chapitre 4.2.5, nous avons décrit le comportement biphasique observé pour certains mutants. Ce comportement est particulièrement prononcé pour les réactions du Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-elamp}]$ avec L12A et E68G L12A. Étant donné que les mesures de fixation ont également montré un comportement particulier de Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-elamp}]$, il devenait intéressant de suivre le taux de fixation en fonction de l'avancement de la réaction biphasique. Afin de réaliser une telle expérience il s'agissait d'établir d'abord une technique appropriée d'interruption de la réaction et d'analyse du mélange n'ayant réagi que partiellement.

La réaction étudiée est la réduction de Pc L12A par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-elamp}]$.

4.3.4.2 Résultats

Trois méthodes ont été utilisées, la première arrête la réaction par séparation des réactifs au moyen d'un tamisage moléculaire, la seconde par élimination d'un des réactifs: $Pc(Cu^{II})$ est réduit rapidement par un très large excès d'acide ascorbique. La troisième méthode est une combinaison des deux premières, à savoir qu'après tamisage moléculaire, l'excès de plastocyanine est réduit avec l'acide ascorbique.

Pour le tamisage moléculaire (G-25SF et FPLC, méthode décrite en annexe 3) les conditions sont les suivantes: $T = 22.5^{\circ}C$ (RT); $[Pc(Cu^{II})] = 2 \cdot 10^{-4}M$; $[Co^{II}] = 4 \cdot 10^{-3}M$; tampon phosphate pH 7.0; $I = 0.12M$. 1 ml de mélange réactionnel est chargé sur la colonne, après un temps de réaction choisi et élué avec le tampon phosphate. Les fractions contenant la plastocyanine sont amenées à un volume précis et le spectre CD est enregistré de 350 à 650nm en 3 accumulations. La contribution de la plastocyanine non réduite, dont la concentration est déterminée par spectroscopia UV/Vis, est déduite, donnant ainsi le spectre CD du produit binucléaire (Fig. 68).

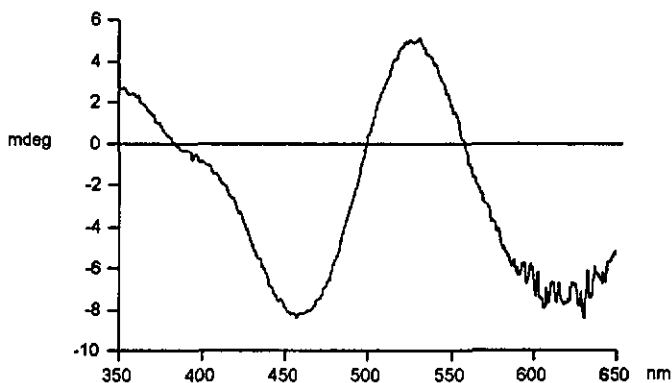


Fig. 68: Signal CD du mélange réactionnel après ~40% de réaction. Réaction arrêtée par tamisage moléculaire, après correction de la contribution de Pc L12A non réagie.

Pour la méthode avec l'acide ascorbique, les conditions sont les suivantes: $T = 25^{\circ}\text{C}$; $[\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})] = 10^{-4}\text{M}$; $[\text{Co}^{\text{II}}] = 2 \cdot 10^{-3}\text{M}$; tampon phosphate pH 7.0; $I = 0.12\text{M}$; [ac. ascorbique] = $\sim 10^{-2}\text{M}$, amené à pH 7.0 avec NaOH dilué. A trois mélanges réactionnels (500 μl de $\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})$ + 500 μl de complexe) sont ajoutés 100 μl de la solution d'ac. ascorbique à différents temps réactionnels précis. Le report de ces temps sur une trace cinétique étalon effectuée dans les mêmes conditions (Fig. 69) permet d'établir le moment de l'arrêt. Les échantillons sont alors dialysés comme pour les mesures de fixations et le spectre CD est enregistré de 350 à 650nm en 3 accumulations.

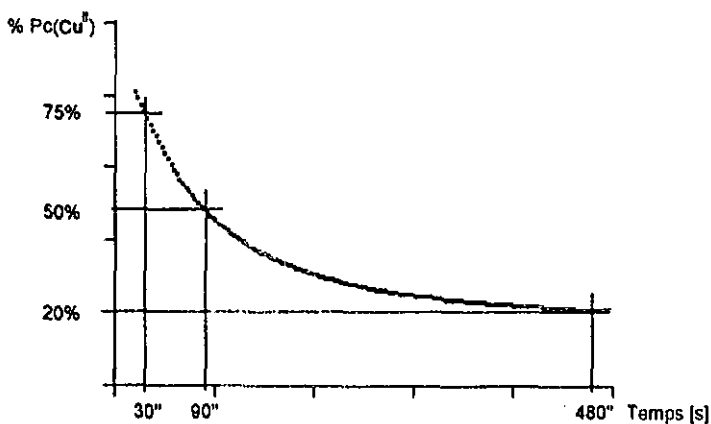


Fig. 69: Cinétique étalon de la réduction de Pc L12A par Δ -[$\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}$] et détermination de l'avancement de la réaction par report des temps t de l'arrêt de la réaction.

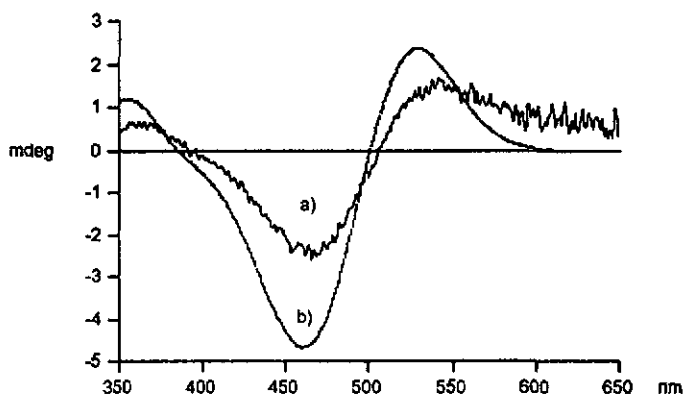


Fig. 70: a) Spectre CD du mélange réactionnel: Pc L12A et Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] dialysé (réaction arrêtée à $t = 30''$). b) Spectre de référence de Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp) L-his]⁺ correspondant à la concentration de plastocyanine réagie.

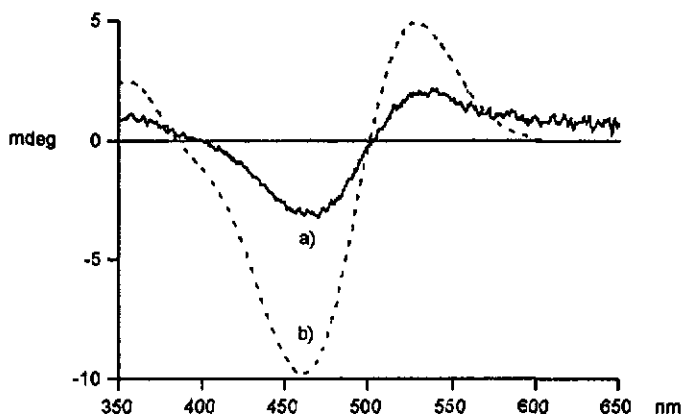


Fig. 71: a) Spectre CD du mélange réactionnel: Pc L12A et Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] dialysé (réaction arrêtée à $t = 90''$). b) Spectre de référence de Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp) L-his]⁺ correspondant à la concentration de plastocyanine réagie.

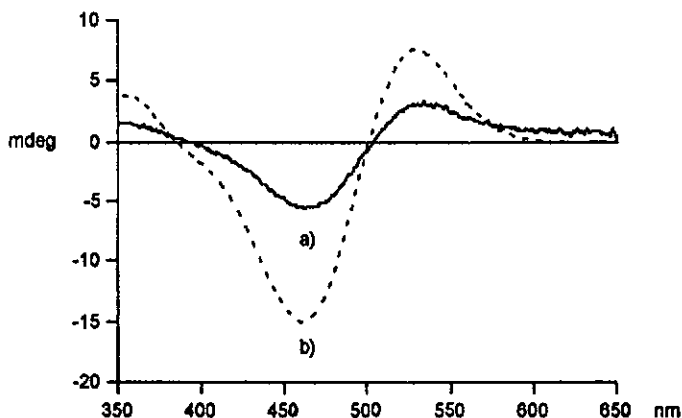


Fig. 72: a) Spectra CD du mélange réactionnel: Pc L12A et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)] dialysé (réaction arrêtée à $t = 480''$). b) Spectra de référence de Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp) L-his]⁺ correspondant à la concentration de plastocyanine réagie.

La troisième méthode utilise les mêmes conditions que la première. Une mesure à 597 nm au spectrophotomètre sur la fraction G-25SF contenant la plastocyanine permet d'établir le moment de l'interruption de la réaction. Le signal de $Pc(Cu^{II})$ est ensuite supprimé par réduction en $Pc(Cu^I)$ avec 5 μ l d'une solution d'acide ascorbique, amenée à pH 7.0 avec NaOH. Le spectre CD est enregistré de 350 à 650 nm en 3 accumulations avant et après cette réduction.

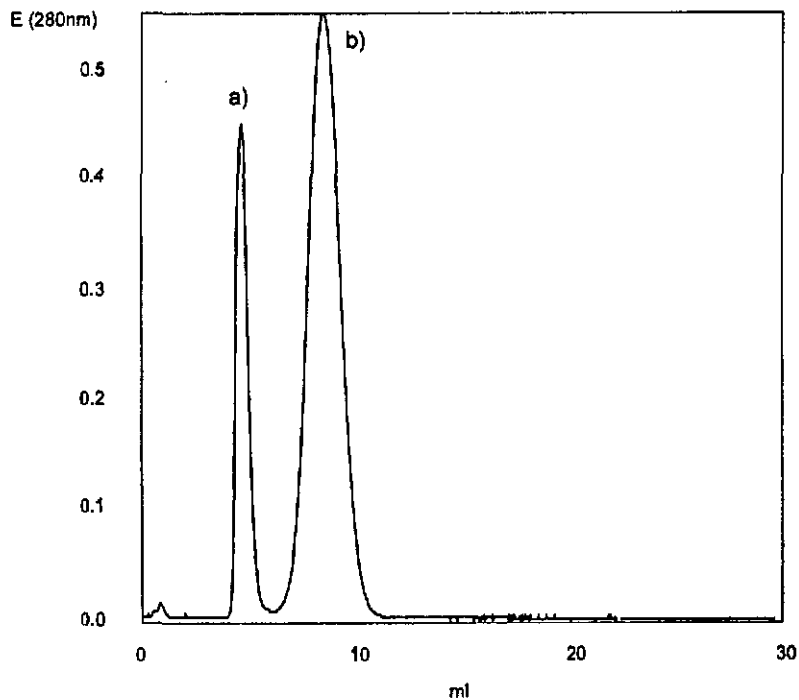


Fig. 73: Profil d'élution du mélange réactionnel sur G-25SF (FPLC) per tampon phosphata 100mM, pH 7.0. a) la fraction protéique et b) l'excès de Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp].

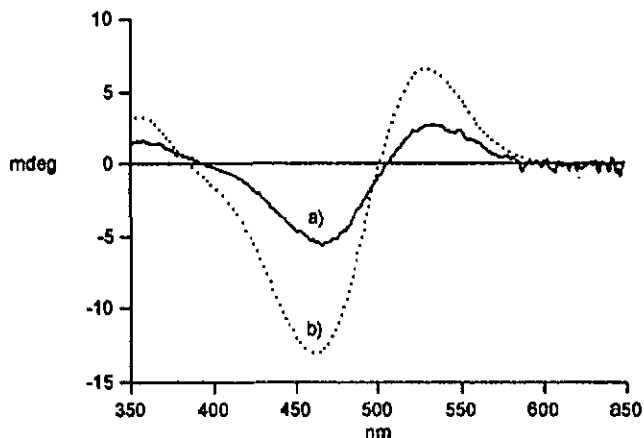


Fig. 74: a) Spectra CD du mélange réactionnel après 46% de réaction, errâtée par tamisage moléculaire, déduction faite du signal de la plastocyanine non réagie par réduction. b) spectre de référence de Δ -[Co^{III}((R,R)-alemp) L-his]⁺ correspondant à la concentration de la plastocyanine réagie.

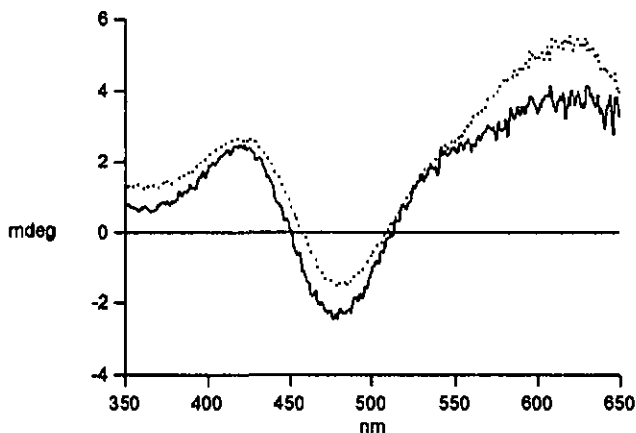


Fig. 75: Spectra différentiel de la fraction protéique avant et après réduction avec l'ac. ascorbique. En pointillé, spectre de Pc L12A correspondant à une concentration équivalente à la plastocyanine non réagie.

4.3.4.3 Discussion

Ces mesures préliminaires posent d'emblée un problème important par la quantité de protéine engagée. La quantité de plastocyanine utilisée ne permet d'obtenir qu'un faible signal CD, déjà entaché d'une erreur de $\pm 10-15\%$, due à la précision de l'instrument. Il faudrait utiliser une concentration initiale de plastocyanine de l'ordre $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour la méthode de l'acide ascorbique et de $4 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour le tamisage moléculaire. De telles quantités sont laborieuses à obtenir.

Les expériences de tamisage moléculaire pose en plus le problème de l'interprétation du signal (Fig. 68). Ce signal est la somme de $\text{Pc}(\text{Cu}^I)\text{-}\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$ et de $\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})$ et la soustraction de ce dernier est difficile. Un autre désavantage est que la méthode nécessite un délai d'environ 90 secondes avant de commencer la séparation, le temps de remplir le réservoir de chargement et de porter l'échantillon sur la colonne. Avec cette méthode, on ne peut donc pas analyser les 90 premières secondes de la réaction. Cependant l'avantage est de connaître le taux de réaction, sans pour autant que l'on puisse le choisir précisément. On peut en effet mesurer au spectrophotomètre dans la fraction protéique la concentration de plastocyanine n'ayant pas encore réagi. Notons encore que pour une bonne séparation il faut charger $500\mu\text{l}$ de mélange sur la colonne.

Les expériences avec l'acide ascorbique sont faciles à réaliser mais pose le problème de la détermination du taux de réaction. En effet, la détermination faite en reportant le temps t_d de l'arrêt sur une réaction étalon suivie à 597nm est peu précise.

La combinaison des deux méthodes, le tamisage moléculaire sur G-25SF et la réduction à l'ac. ascorbique répond aux problèmes des deux méthodes. La réduction de la fraction contenant la $\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})$ résout d'une part le problème de l'interprétation du signal après tamisage moléculaire, d'autre part la mesure de la concentration en $\text{Pc}(\text{Cu}^{\text{II}})$ non-réagi permet de déterminer avec précision le taux de réaction.

Pour des mesures plus précises, il faudra toutefois améliorer les méthodes en prenant garde d'utiliser des concentrations suffisamment importantes de plastocyanine et en maîtrisant mieux le taux de réaction. Une telle maîtrise peut être obtenue en abaissant la température de la réaction, ce qui pose pour la méthode de tamisage moléculaire le problème de la thermostatisation du réservoir de chargement et de la colonne.

Néanmoins, les résultats obtenus lors des essais préliminaires avec G-25SF et l'acide ascorbique apportent des informations qualitatives (Fig. 70 à 72 et 74), qui seront discutées dans la discussion générale.

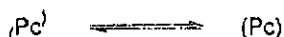
4.4 Tentatives de caractérisation de l'équilibre entre Pc et Pc'

Parmi toutes les possibilités d'équilibre entre Pc et Pc', nous en avons envisagé trois.

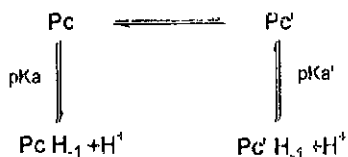
Si il s'agit d'un équilibre de formation d'un dimère, on aurait alors:



Ou alors l'équilibre réside entre une forme incomplètement repliée (Pc') - mais fonctionnelle - et une forme complètement repliée (Pc), on a alors:



Enfin c'est un changement de conformation lent, dépendent du pH, qui établit la différence entre Pc et Pc', on aurait alors:



Les deux premières possibilités d'équilibre sont analysables par tamisage moléculaire sur Superdex (FPLC, méthode en annexe 4). Cette méthode permet en effet de distinguer des protéines différant d'un facteur 2 dans leur poids moléculaire, ainsi que les deux formes pliée et non pliée d'une même protéine. La figure 76 montre que l'hypothèse de la formation d'un dimère et celle d'un pliage important sont à rejeter. Le pic de la plastocyanine est unique et parfaitement symétrique. Si on peut réfuter l'hypothèse d'un équilibre basé sur un important repliement de la plastocyanine, on ne peut cependant pas exclure avec cette méthode des variations plus fines de la structure secondaire ou tertiaire du polypeptide. Ces fines variations pourraient être importantes aux vues de l'accessibilité au site pour le TE.

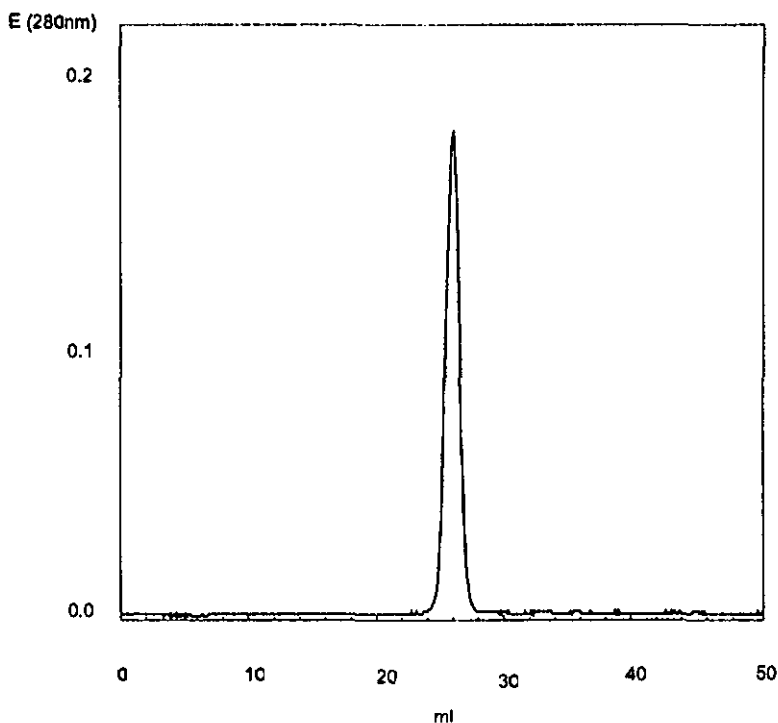


Fig. 76: Profil d'élution de Pc L12A sur Superdex 75 par tampon phosphate 0.1M, pH 7.0

L'hypothèse d'un équilibre de conformation dépendant du pH nous a été suggérée par le résultat d'un gel de focalisation isoélectrique. La résolution de ce gel a été poussée à 0.0125 unité pH / mm. On remarque alors un dédoublement des bandes à pH \sim 4.20 (Fig. 77). Ce résultat n'a cependant que la valeur de suggérer une hypothèse. En effet, il n'a été effectué qu'une fois et compte tenu des difficultés d'une telle manipulation, dues au fait que le plastocyanine peut précipiter à de tels pH (cf. chapitre 2.4.12), il doit être considéré avec toutes réserves.

Afin d'éprouver cette hypothèse, plusieurs tentatives de séparation des deux formes dépendantes du pH de la plastocyanine ont été menées par chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q, FPLC, méthode en annexe 5). Les chromatographies ont été effectuées à trois pH différents: 6 (bis-Tris-HCl, 50mM), 7 (Tris-HCl, 50mM) et 8 (Tris-HCl, 50mM) mais aucune n'a permis la mise en évidence de deux formes différentes.

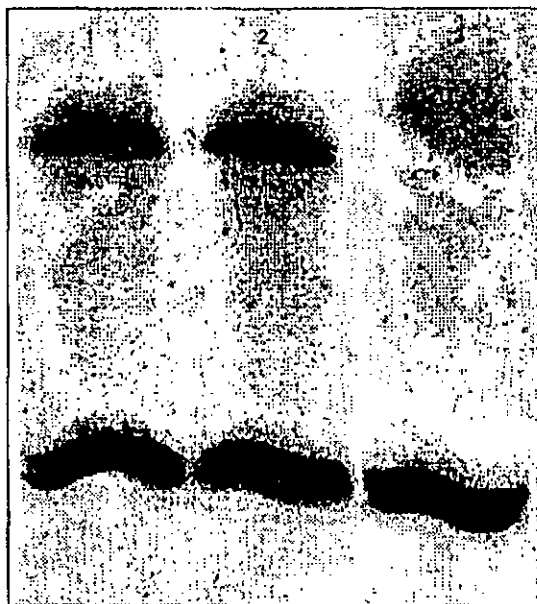


Fig. 77: Agrandissement é 150% d'un gel IF de pH 2.5 é 5 sur 200mm. A cette échelle, la résolution est 0.01875 unité pH/mm 1) Pc nt, 2) Pc wt et 3) Pc L12A.

En résumé, cet équilibre ne tient ni de la formation d'un dimère, ni d'un repliage important de la protéine et il n'e pas été possible de mettre en évidence avec certitude un équilibre acido-basique. L'investigation de cet équilibre reste donc un domaine largement ouvert.

4.5 Discussion comparative des cinétiques de transfert d'électron et des mesures de fixation pour les différents mutants

Suite aux résultats obtenus lors des essais de fixation des complexes de cobalt après le TE, décrits dans le chapitre précédent, il est intéressant de voir si ils apportent des informations supplémentaires aux résultats cinétiques et aux mécanismes proposés. A ce sujet, il faut se rappeler trois hypothèses formulées:

- a) Deux formes de plastocyanine sont en équilibre Pc et Pc' .
- b) La transformation entre les deux formes est relativement lente comparée aux vitesses de TE.
- c) Il existe au moins deux sites de TE localisés dans la région hydrophobe, dont l'un fait intervenir le groupe imidazole de l'histidine 87.

Afin de faciliter la comparaison, tous les résultats de cinétique et de fixation sont reproduits encore une fois dans le tableau 13.

Tableau 13: Constantes de vitesse des différentes réactions de réduction de la plastocyanine par a) $[Co^{II}(promp)]$ b) $[Co^{II}(alamp)]$ à 25°C, stéréosélectivité pour les réactions à 25°C et taux moyens de fixation du complexe correspondant de $Co(III)$ suite à la réduction.

a) $[Co^{II}(promp)]$

Mutants	k_{et} [$M^{-1}s^{-1}$] à 25°C		Stéréosélectivité à 25°C K_{etA} / K_{etB}	Taux de fixation moyens à 25°C	
	K_{etA}	K_{etB}		Δ	Λ
Pc wt	1.20	1.70	0.71	0 %	0 %
L12G	1.11	1.40	0.79	0 %	0 %
L12A	1.03	1.12	0.92	0 %	0 %
L12V	1.41	1.68	0.84	0 %	0 %
L12F	1.08	1.31	0.82	0 %	0 %
E68G	2.39	3.10	0.77	0 %	0 %
E68G L12A	1.22	1.55	0.79	0 %	0 %

b) $[Co^{II}(alamp)]$

	K_{etA}	K_{etB}	K_{etA} / K_{etB}	Δ	Λ
Pc wt	1.14	1.38	0.83	50%	100%
L12G	4.5	4.6	0.98	100%	100%
L12A	10.2*	6.9*	1.48*	75%	100%
L12V	4.6	3.1	1.48	60%	100%
L12F	0.53	0.53	1	65%	100%
E68G	4.0*	3.8*	1.05*	80%	100%
E68G L12A	9.3*	6.0*	1.55*	80%	100%

*indique les cinétiques biphasiques, pour lesquelles K_{et} est établi sur la partie initiale de la cinétique.

Vu les résultats de fixation avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp], il devient évident que le schéma 1 doit être modifié. En effet, la réaction globale est composée de deux réactions parallèles, l'une de type "inner sphere" conduisant au produit binucléaire (k_{is}) et l'autre de type "outer sphere" conduisant à l'aque-complexe de Co^{III} (k_{os}). En admettant que les deux mécanismes soient possibles sur les deux formes, la réaction est ainsi caractérisée par quatre constantes de vitesse:

$$k_{\Delta}^{et} = k_{\Delta(IS)}^{et} + k_{\Delta(OS)}^{et} \quad \text{et} \quad k_{\Delta}^{it} = k_{\Delta(IS)}^{it} + k_{\Delta(OS)}^{it}$$

Bien que la réaction avec l'énantiomère Λ apparaît suivre quantitativement le mécanisme sphère interne, la possibilité d'une réaction sphère externe ne peut pas être exclue:

$$k_{\Lambda}^{et} = k_{\Lambda(IS)}^{et} + k_{\Lambda(OS)}^{et} \quad \text{et} \quad k_{\Lambda}^{it} = k_{\Lambda(IS)}^{it} + k_{\Lambda(OS)}^{it}$$

Le schéma réactionnel modifié se présente alors de la manière suivante:

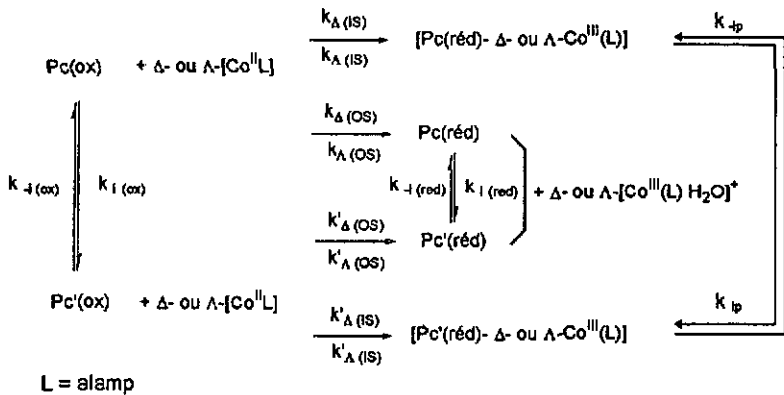


Schéma 2.

En combinant les résultats des mesures cinétiques et la fixation du Co^{III} nous pouvons distinguer cinq comportements différents:

- 1) La réaction suit une loi cinétique de pseudo-premier ordre et le réactif est fixé à 100%. Ce comportement est observé pour la réaction de Pc nt, Pc wt, L12G, L12V et L12F avec Λ -[Co^{II}(S,S)-alamp] et de L12G avec Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp].
- 2) Le cinétique est de pseudo-premier ordre et il n'y a aucune fixation de Co^{III} sur la protéine: toutes les réactions avec [Co^{II}(promp)].

- 3) Une cinétique de pseudo-premier ordre et une fixation partielle de Co^{II} sont observées: réactions de Pc nt, Pc wt, L12V et L12F avec $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$.
- 4) Les systèmes montrent une cinétique biphasique et conduisent à une fixation quantitative: réactions de L12A, E68G et L12A E68G avec $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{S,S})\text{-elempl}]$.
- 5) Cinétique biphasique et fixation partielle: réactions de L12A, E68G et E68G L12A avec $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$.

Aucun cas de cinétique biphasique sans fixation n'a été observé.

Le comportement 1) peut être expliqué par trois hypothèses:

- a) Il n'existe qu'une forme de plastocyanine.
- b) La réaction d'isomérisation entre Pc et Pc' est plus rapide que le TE.
- c) Pendant la réaction les deux formes se trouvent à l'équilibre. L'isomérisation est lente et le TE se déroule à des vitesses comparables avec les deux formes.

Le comportement 3) peut également être expliqué par trois hypothèses:

- a) une seule forme de plastocyanine mais $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$ réagit sur deux sites différents.
- b) Deux formes de plastocyanine, une réagit par fixation, l'autre pas.
- c) Deux formes de plastocyanine et sur chacune la réaction peut avoir lieu sur deux sites.

Le comportement biphasique 4) et 5) ne peut être expliqué qu'en admettant un équilibre entre deux formes de plastocyanine. Il est intéressant de constater que les vitesses de la première phase sont entre 3 et 10 fois plus grandes que celles des réactions avec Pc wt. La deuxième phase serait alors déterminée, soit par la vitesse d'isomérisation, soit par une réaction avec la deuxième forme plus lente que celle avec la première. Une distinction entre ces deux solutions devrait être possible par la mesure du taux de fixation en fonction de l'avancement de la réaction. Les expériences réalisées à ce sujet ont été décrites dans le chapitre 4.3.4 et ont donné les résultats repris dans le tableau 14.

Tableau 14: Taux de fixation en fonction de l'avancement de la réaction L12A + Δ -[Co^{II}(R,R)-alamp] à 25°C.

% de l'avancement de la réaction	25	46*	50	80	100**
Taux de fixation (en %)	50	40	33	40	75

* Méthode par tamisage moléculaire

** Résultat séparé

Ces valeurs montrent, que le taux de fixation pendant la première phase correspond approximativement à celui de la Pc wt. Pendant la deuxième phase, ce taux ne semble pas diminuer. Comparé au résultat de fixation final, il devrait plutôt augmenter, ce qui permettrait la conclusion suivante: la vitesse limitante dans la deuxième phase est celle du TE avec la deuxième forme et qu'il ne s'effectue que par le mécanisme sphère interne.

Il faut cependant relever qu'il s'agit d'une seule série de mesures et qu'elles sont très délicates. Les résultats obtenus demandent donc confirmation.

Le cas du mutant L12F, qui a été discuté en détails précédemment, ne montre pas de stéréosélectivité cinétique dans les réactions avec [Co^{II}(alamp)]. Néanmoins une sélection se manifeste dans le choix du site réactionnel (cf. taux de fixation, tableau 14). Ceci n'est possible que si la sélection conduisant à des produits différents s'opère dans une réaction rapide, consécutive à l'interconversion des deux formes non-active et active.

Hypothèses de mécanismes réactionnels

Contrairement aux réactions avec [Co^{II}(alamp)] les mutations ne modifient que relativement peu la vitesse et les paramètres d'activation des réactions avec les deux énantiomères de [Co^{II}(promp)], en plus aucune fixation n'a lieu. On peut ainsi formuler deux hypothèses de mécanisme réactionnel:

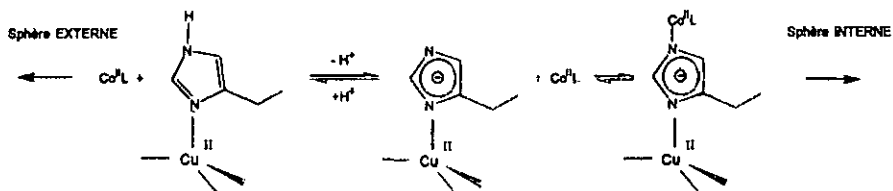
e) Dans la première, un site spécifique est supposé pour les réactions avec [Co^{II}(promp)], site utilisé par les deux énantiomères de [Co^{II}(promp)] mais différent des deux utilisés par [Co^{II}(alamp)]. En plus des similitudes des vitesses et des paramètres d'activation pour les réactions de l'ensemble des plestocyanines avec [Co^{II}(promp)], l'argument principal en faveur de cette hypothèse est donné par le comportement de L12F. En effet, il est apparu que dans la réaction de ce mutant avec [Co^{II}(alamp)] un changement de position du

groupe phényl était nécessaire et cela aussi bien pour la réaction de sphère interne que de sphère externe et que la vitesse de ce changement était limitante. Or, la réaction avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ et L12F se déroule deux fois plus vite qu'avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ et les paramètres d'activation sont fortement différents. La vitesse de cette réaction n'est donc pas limitée par le changement de conformation.

Des trois sites supposés, un est connu. En effet, le site conduisant à la fixation de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ oxydé a été déterminé sur la base de la variation du taux de fixation de l'énantiomère Δ sur la Pc nt en fonction du pH [5]. Il s'agit de l'unité déprotonée de l'histidine 87.

En ce qui concerne le site conduisant à l'aqua-complexe comme produit de la réaction avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$, on peut envisager plusieurs possibilités.

- Le TE a lieu également par l'intermédiaire du groupe imidazole de l'histidine 87 mais sous forme protonée, par un mécanisme de sphère externe (schéma 3)



Le TE sphère interne serait alors de plusieurs ordres de grandeur plus rapide, étant donné la faible proportion de la forme déprotonée à $\text{pH} = 7$.

- Des études concernant un TE entre deux complexes ont montré que le centre métallique du réactif labile peut s'associer avec un groupe carbonyle du partenaire, formant ainsi l'intermédiaire pour le TE [82]. On peut alors admettre dans notre cas un site de type carbamide d'une liaison peptidique, proche de l'histidine 87 (schéma 4):

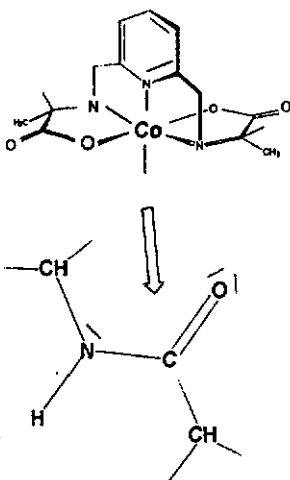


Schéma 4

Il ne s'agirait plus alors d'un mécanisme sphère externe mais bien interne ne conduisant pas à un produit binucléaire stable.

Comparé à ce site, celui utilisé par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ serait de même nature mais localisé ailleurs dans la poche hydrophobe, suffisamment loin de Leu 12 pour ne pas être influencé par les mutations de cette position.

b) Dans la seconde hypothèse, on admet un site commun pour les réactions conduisant aux aqua-complexe de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ et de $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R-alam})]$. Ce site serait alors utilisé avec des efficacités différentes par les complexes cités. Ces différences pourraient s'expliquer par les possibilités pour chaque complexe d'approcher le site. L'encombrement stérique de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$, dû aux cycles de proline, l'empêche de s'approcher tout près du site commun. Par contre $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alam})]$ plus petit peut s'approcher davantage. Dans cette situation la réduction de l'encombrement en position 12 facilite l'approche de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alam})]$, expliquant ainsi l'augmentation de la vitesse réactionnelle, mais ne serait pas suffisante pour favoriser celle de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$.

Tout comme dans l'hypothèse discutée sous a), la nature de ces sites n'est pas clairement définie. Il faut pour cette deuxième hypothèse considérer les mêmes possibilités que dans la première.

Sans qu'il ne soit possible de réfuter avec certitude l'hypothèse du site commun, il faut remarquer qu'elle est peu probable. En effet, c'est donner trop d'importance à l'encombrement stérique que d'appuyer sur lui seul l'explication d'autant de différences entre les réactions avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ et $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$. Il est donc plus raisonnable d'admettre au moins trois sites, un conduisant au produit binucléaire avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$, un autre conduisant à l'aqua-complexe $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{III}}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{H}_2\text{O}]^+$ et le dernier conduisant aux aqua-complexes $\Delta\text{-}$ ou $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]^+$

5 La stabilité de la plastocyanine dans un tampon imidazole

5.1 Introduction

Le site actif de la plastocyanine est un atome de cuivre lié sous forme tétraédrique distordue à deux résidus histidine, une méthionine et une cystéine. Plusieurs métaux peuvent remplacer le cuivre, mais lui seul conduit à une protéine dont le potentiel rédox correspond aux exigences physiologiques. L'incorporation du cuivre lors de la biosynthèse est encore mal connue, elle peut intervenir après la polymérisation du polypeptide, comme dans le cas d'autres métalloprotéines [83,86]. Bien que plusieurs facteurs peuvent avoir leur importance (processus de transport, abondance relative des ions métalliques dans le milieu, potentiels redox), l'incorporation sélective d'un ion particulier s'explique finalement par des facteurs cinétiques ou thermodynamiques [87]. Des mesures *in vitro* d'incorporation du cuivre dans des protéines de cuivre bleu ont été menées pour l'apoazurine et l'apostellacyanine (une description plus détaillée se trouve dans la thèse de Verardo). Des réactions de TE dans un tampon imidazole avec la plastocyanine native ont montré que la présence d'imidazole provoque une décoloration [5]. L'ajout de $K_3Fe(CN)_6$ ne restaure pas la coloration bleue de la protéine oxydée, contrairement à l'apport de cuivre(II), ce qui démontre qu'il ne s'agit pas d'une réduction mais d'un équilibre de répartition du cuivre(II) entre l'apoprotéine et l'imidazole. L'étude des cinétiques à 25°C et à pH = 7.0 de cette décoloration en fonction de la concentration en imidazole (im.) a permis à Verardo de proposer le mécanisme suivant:

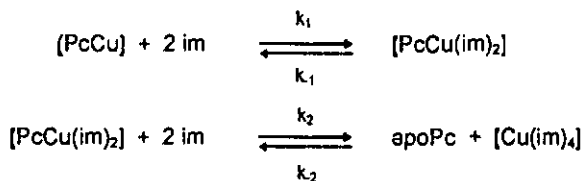


Schéma 5

5.2 Séquestration du Cu(II) des plastocyanines par l'imidazole

Les différentes solutions tampon ont été préparées par dilution d'une solution à pH = 7.0, dont la concentration en imidazole non protoné est connue précisément par titration acidimétrique. La force ionique de ces solutions est fixée à 0.5M par NaCl. Les solutions de protéine sont préparées par dilution dans NaCl 0.5M de l'échantillon concentré, de sorte à obtenir une concentration dans le mélange réactionnel de $\sim 10^{-4}$ M ($E_{597nm}^{\circ} \sim 0.2$).

Les mesures cinétiques sont réalisées au spectrophotomètre UVIKON 930 dans des cuves tandem (Hellma) de 1 cm thermostatisées à 25°C. Ces cuves permettent de mesurer précisément la valeur de l'absorption initiale avant le mélange des réactifs.

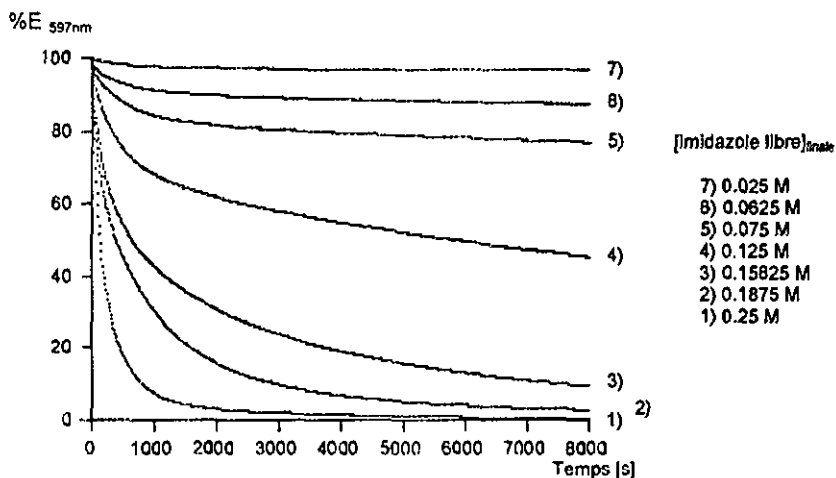


Fig 78: Traces cinétiques de Pc wt pour différentes concentrations d'imidazole.

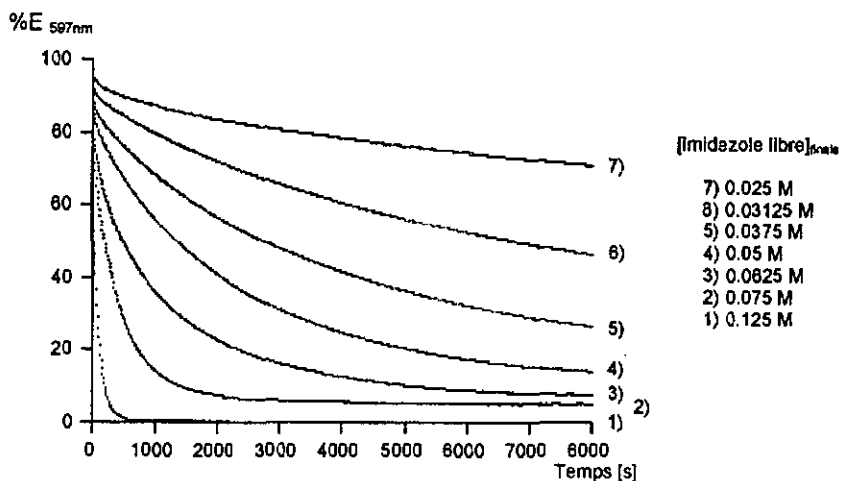


Fig. 79: Traces cinétiques de Pc L12G pour différentes concentrations d'imidazole.

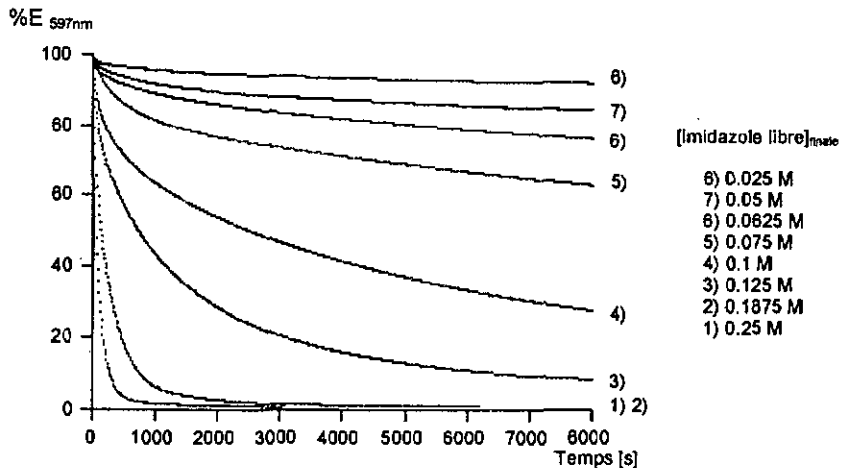


Fig. 80: Traces cinétiques de Pc L12A pour différentes concentrations d'imidazole.

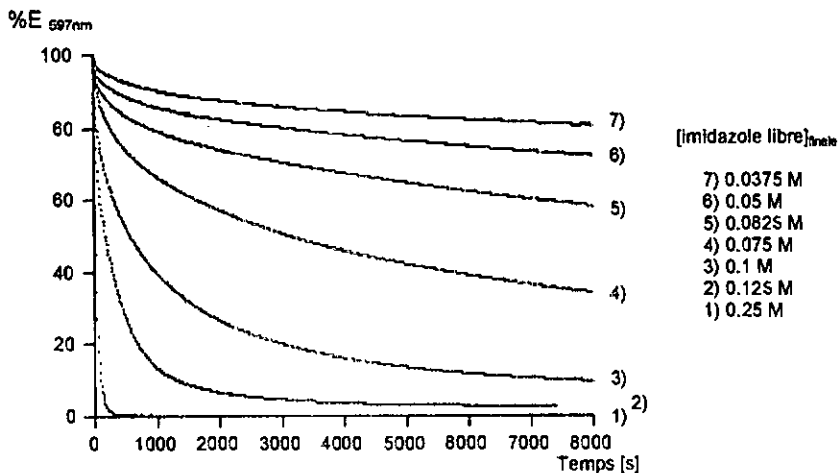


Fig. 81: Traces cinétiques de Pc L12V pour différentes concentrations d'imidazole.

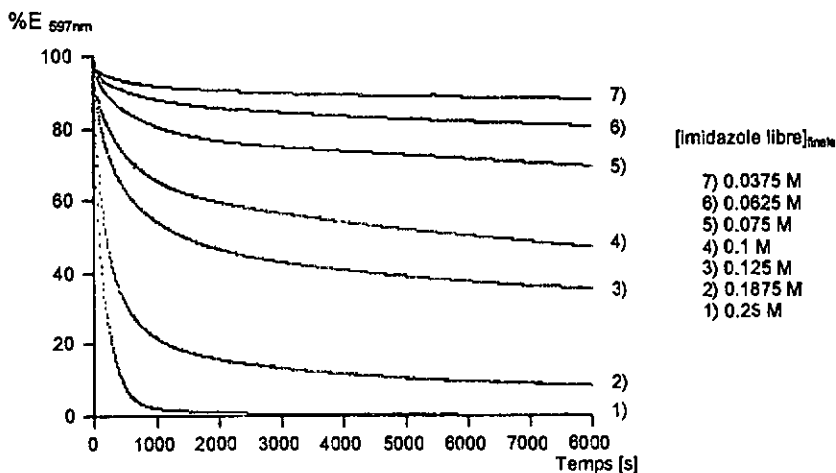


Fig. 82: Traces cinétiques de Pc L12F pour différentes concentrations d'imidezole.

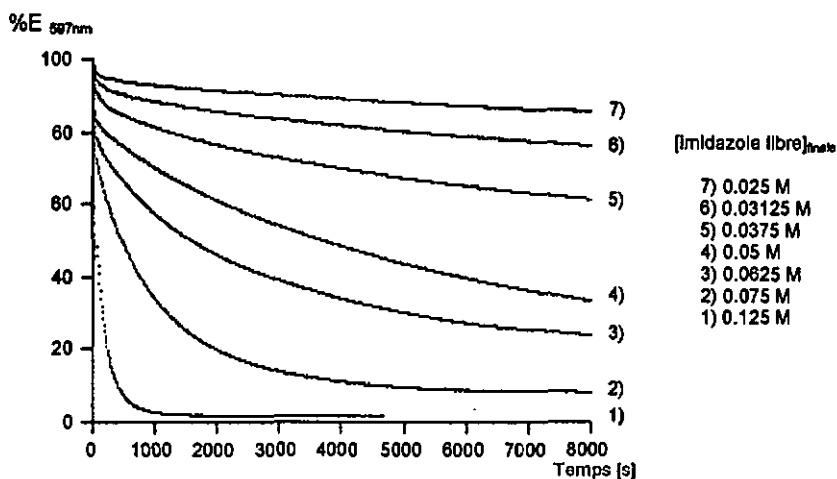


Fig. 83: Traces cinétiques de Pc E68G pour différentes concentrations d'imidezole.

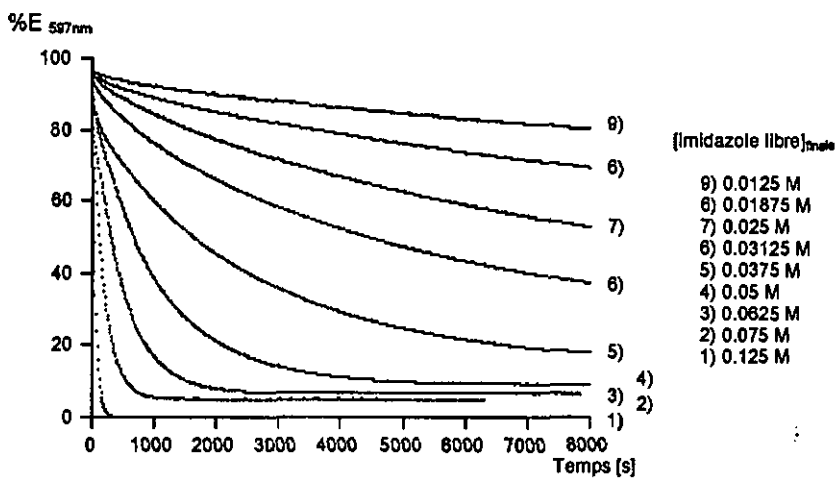


Fig. 84: Traces cinétiques de Pc E68G L12A pour différentes concentrations d'imidezole.

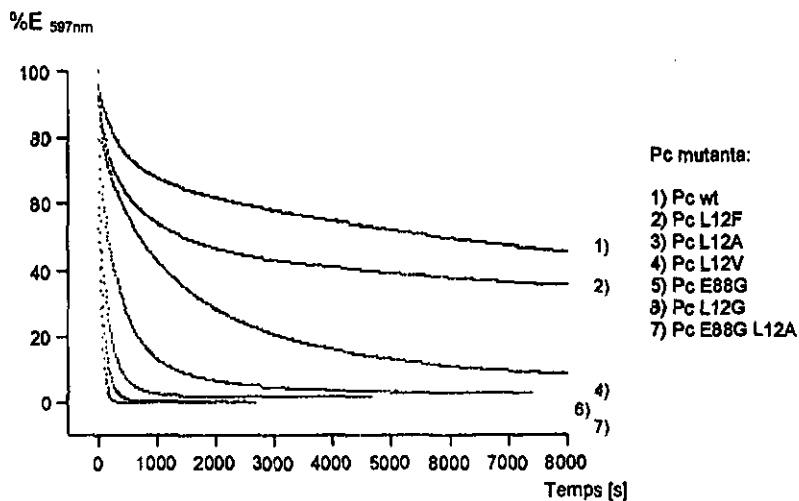


Fig. 85: Traces cinétiques des différentes plastocyanines pour 0,125M [im. libre]_{finale}.

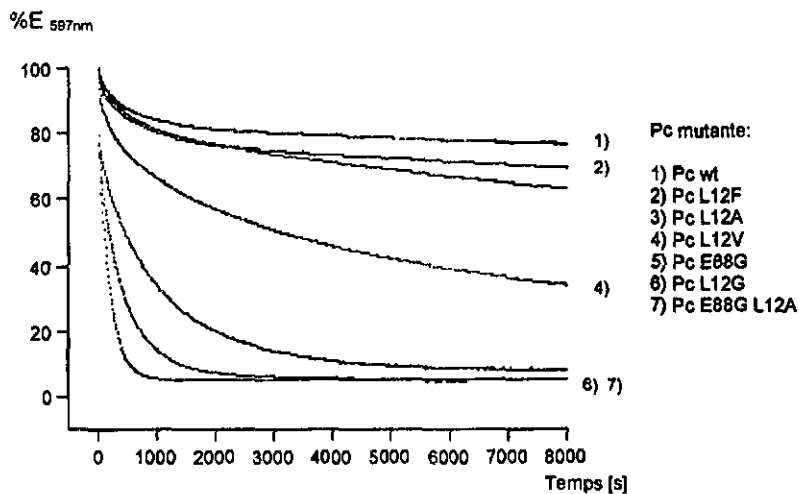


Fig. 86: Traces cinétiques des différentes plastocyanines pour 0,075M [im. libre]_{finale}.

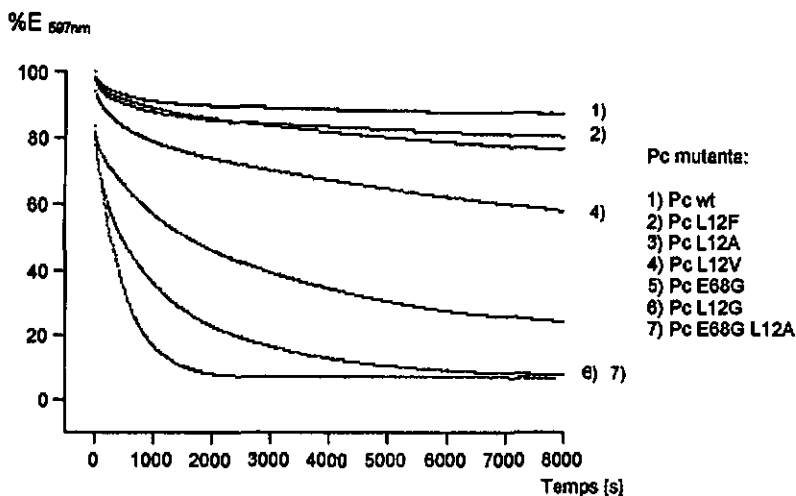
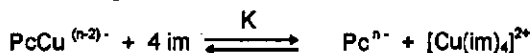


Fig. 87: Traces cinétiques des différentes plastocyanines pour $0,0625M [im. libre]_{finale}$.

Les figures 78 à 84 suggèrent que le comportement des six mutants est qualitativement le même que celui de Pc wt et Pc nt, correspondant au schéma 5. Des différences quantitatives importantes dans les vitesses réactionnelles sont néanmoins apparentes. Ces résultats permettent de discuter les caractéristiques suivantes:

- La situation de l'équilibre finale.
- La vitesse initiale de la première phase.
- La vitesse réactionnelle pendant la deuxième phase.
- Les coefficients d'absorption de l'intermédiaire

Les valeurs de l'absorption à t_{∞} (Tableau 15) permettent de calculer les constantes conditionnelles de l'équilibre global:



$$K = \frac{[Cu(im)_4^{2+}][Pc^{n\cdot}]}{[PcCu^{(n-2)\cdot}][im]^4}$$

Le tableau 15 reprend les valeurs de $\%E_{(1 \rightarrow \infty)}$ pour différentes concentrations d'imidazole.

Tableau 15: Valeurs à t_{∞} en % de l'absorbance initiale.

[im. libre] M calculée	[im. libre] M titrée	Pc wt	L12G	L12A	L12V	L12F	E68G	E68G L12A
0.25	0.248	0*	-	0*	0*	0*	0*	-
0.188	0.185	1.5	-	1	-	6.8	-	-
0.156	0.155	2	-	-	-	-	-	-
0.125	0.122	32	0*	6.6	2.8	30.3	2.5	0*
0.1	0.102	-	-	7.7	9	32.7	-	-
0.075	0.0816	53	4.6	27	24.3	47.9	8.8	4.2
0.0625	0.0612	74	6.8	36	38.4	70.6	21	6.8
0.05	0.0489	-	10.4	80.4	60.5	-	20.7	9.3
0.0375	0.0408	-	17	-	73.7	83.1	51.5	12
0.0313	0.0306	-	27.7	-	-	-	68.4	23
0.025	0.0245	89.5	37.6	84.8	-	-	79.4	28.6
0.0188	0.0204	-	-	-	-	-	-	40.7
0.0125	0.0122	-	-	-	-	-	-	44.6

* définis comme étant égale à 0%.

Les constantes K calculées selon la concentration nécessaire en imidazole pour enlever 50% du Cu^{2+} :

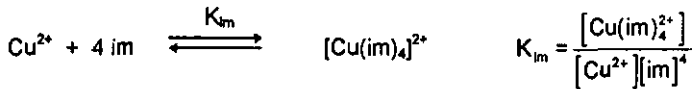
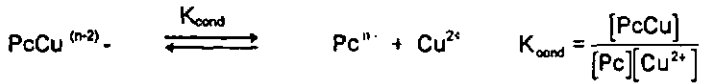
$$K = \frac{C_{\text{pc}}}{2 [\text{im}]^4} \quad C_{\text{pc}} = 10^{-4} \text{M}$$

et les valeurs $\Delta\Delta G^0$, calculées selon la relation:

$$\Delta\Delta G^0 = -RT \ln (K_{\text{mutant}} / K_{\text{wt}})$$

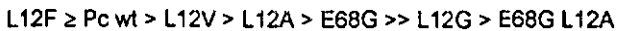
ainsi que la log des constantes de stabilité conditionnelles à pH = 7 ($K_{\text{cond.}}$) sont données dans le tableau 16.

Etablissement des constantes conditionnelles K_{cond} :



$$K_{\text{cond}} = \frac{K_{\text{im}}}{K} \quad K_{\text{im}} = 4 \cdot 10^{12}$$

Sur la base de ces résultats, il est possible d'attribuer une stabilité relative à la série des mutants:



Cette stabilité relative est en accord avec l'observation que le mutant E68G L12G ne soit pas exprimé sous une forme fonctionnelle. En effet, la stabilité de E68G L12A, qui représente vraisemblablement une limite correspond à une constante conditionnelle à pH = 7 de $10^{9,9}$, valeur en dessous de laquelle le Cu^{2+} ne peut plus être retenu dans le site actif.

Tableau 16: Valeurs des constantes K de l'équilibre global pour toutes les plastocyanines recombinantes, du log. des constantes de stabilité conditionnelles ($\log K_{\text{cond}}$) et des $\Delta\Delta G^0$ [kJ mole⁻¹] par rapport à Pc wt.

protéine:	Pc nt	Pc wt	L12G	L12A	L12V	L12F	E68G	E68G L12A
K:	2.3	1	238	7.94	5.01	1.14	21.8	545
$\log K_{\text{cond}}$:	12.2	12	10.2	11.7	12.9	12.5	11.3	9.9
$\Delta\Delta G$:	-	(-0.04)*	-0.4	-0.06	-0.02	0.1	-0.15	-0.48

*calculé selon $\Delta\Delta G = -RT \ln (K_{\text{wt}} / K_m)$

Au moyen des figures 85 à 87, on peut évaluer et comparer les vitesses de la 1^{ère} et de la 2^{ème} phase des réactions de chacune des plastocyanines. Dans cette évaluation, la première phase est caractérisée par la vitesse initiale v^1_0 , établie selon la relation suivante: $v^1_0 = ([\%Pc(Cu^{II})]_{t_0} - [\%Pc(Cu^{II})]_t) / (t - t_0)$, avec $t = 34''$ et $t_0 = 0''$. Ces valeurs (tableau 17) indiquent que le vitesse de cette première phase est proportionnelle au carré de la concentration d'imidazole, conformément à la première réaction du schéma 5. Le comparaison des vitesses réactionnelles à une concentration d'imidazole permet de calculer un coefficient d'accélération α relativement à Pc wt. Il est intéressant de constater que ces accélérations suivent dans les grandes lignes la même série de mutants que celle observée pour la stabilité globale, à savoir:



Tableau 17: Variation de la vitesse initiale v^1_0 en fonction des mutations pour 0,125; 0,075 et 0,0625 M d'imidazole libre final.

protéine	0.125 M		0.075 M		0,0625 M	
	v^1_0 [% s ⁻¹]	αv^1_0	v^1_0 [% s ⁻¹]	αv^1_0	v^1_0 [% s ⁻¹]	αv^1_0
Pc wt	0.192	1	0.107	1	0.065	1
L12F	0.317	1.65	0.121	1.13	0.085	1.31
L12A	0.370	1.93	0.060	0.56	0.102	1.57
L12V	0.743	3.87	0.233	2.18	0.202	3.03
E68G	1.327	6.91	0.736	6.87	0.588	9.01
L12G	1.586	8.26	0.837	7.82	0.702	10.7
E68G L12A	1.748	9.10	0.914	8.54	0.643	9.84

La vitesse de la deuxième réaction est plus difficile à caractériser. En effet, d'une part elle dépend de la situation d'équilibre de l'intermédiaire - en fonction de k_1 et de k_{-1} - et d'autre part elle-même conduit à un équilibre. Ainsi la détermination de la vitesse de la deuxième phase n'est possible que si elle est suffisamment différente de celle de la première. Il semble pourtant que, à une exception près, la vitesse de la deuxième phase dépendent de la concentration d'imidazole à la quatrième puissance. Ce résultat est obtenu en comparant par exemple les pentes des tangentes aux traces cinétiques de la figure 79 à 30% d'absorption. Ce comportement est conforme au schéma réactionnel (schéma 5) pour autant que l'équilibre de formation de l'intermédiaire se situe du côté des réactifs ($k_1 / k_{-1} < 1$). L'exception est le cas de L12F. Alors que la première phase ne se distingue pas de celle de Pc wt, le comportement pendant la deuxième est clairement différent. La vitesse semble en effet indépendante de la concentration d'imidazole. Selon les valeurs du tableau 17, L12F forme aussi un intermédiaire comprenant deux molécules d'imidazole. Cet intermédiaire doit ensuite subir une réaction conduisant à l'apo-protéine et à $[\text{Cu}(\text{im})_2]^{2+}$, dont la vitesse ne dépend pas de la concentration en imidazole. Comme pour la réaction de TE, il semble raisonnable d'admettre un changement de position du cycle aromatique de la phénylalanine, permettant l'extraction du cuivre. Il faut toutefois mentionner que la réaction dans ce cas est nettement plus lente que celle contrôlant le TE.

Étant donné la difficulté de déterminer la vitesse de la deuxième phase, les valeurs du coefficient d'absorption ϵ de l'intermédiaire (tableau 18), obtenues par extrapolation de la trace cinétique de cette phase au temps zéro, n'ont qu'une signification semi-quantitative. On notera pourtant que ces valeurs se trouvent dans le même ordre de grandeur que celle de la Pc nt obtenue par un traitement mathématique complet de l'ensemble des traces cinétiques [5]. Cette ressemblance se comprend aisément car le chromophore n'est pas modifié par les mutations.

Tableau 18: Valeurs du coefficient d'absorption à 597nm ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] de l'intermédiaire pour les différents mutents de la plastocyanine.

protéine:	Pc nt	Pc wt	L12G	L12A	L12V	L12F	E68G	E68G L12A
ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	2940 ¹	2450	3283	2773	2989	2058	3234	3185

¹ établi par Varado dans sa thèse

5.3 Discussion

Selon la schéma 5, la réaction conduit pendant la première phase à un intermédiaire dont nous supposons qu'il comprend deux molécules d'imidazole, $PcCu(im)_2$. Cette hypothèse est fondée, d'une part sur la loi cinétique observée de la réaction de formation:

$$\frac{d[PcCu]}{dt} = k_1 [PcCu][im]^2$$

d'autre part sur le fait que nous pouvons estimer une constante de formation $K_{(n)}$ de l'intermédiaire par extrapolation de la deuxième réaction au temps zéro (tableau 19):

$$K_{(n)} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PcCu(im)_n]}{[PcCu][im]^n}$$

La pente de la figure 88 montre un exemple de détermination du nombre (n) de molécule d'imidazole impliquée dans ce premier équilibre, pour le cas de E68G (Fig. 83). La valeur obtenue proche de 2 donna la composition de l'intermédiaire $PcCu(im)_2$. Ce résultat est identique à celui obtenu pour la protéine native [5].

Tableau 19: Valeurs utilisées pour la détermination graphique du nombre (n) de molécule d'imidazole impliquée dans le premier équilibre (schéma 5)

$[im]_0$	$\log[im]_0$	* %E [∞] ₍₁₎	** $\log \frac{a}{1-a}$
0.0375	- 1.43	87.4	- 0.273
0.05	- 1.30	81.9	0
0.0625	- 1.204	78	+ 0.191
0.075	- 1.125	74.8	+ 0.360
∞		63.8	

* %E[∞]₍₁₎ valeurs finales d'absorption de la première réaction déterminées par extrapolation de la trace cinétique de la deuxième phase pour t = 0.

** a = $[PcCu(im)_2]$ relative

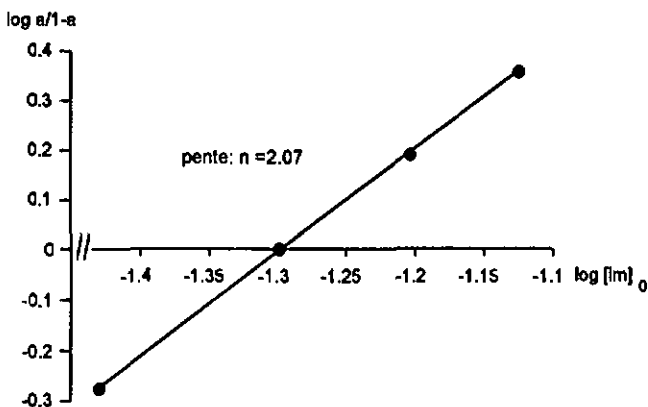
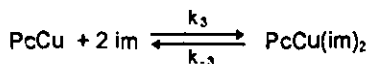


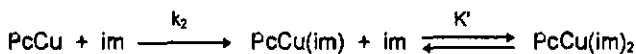
Fig. 88: Détermination graphique de n .

Du point de vue du mécanisme, on peut discuter les trois possibilités suivantes:

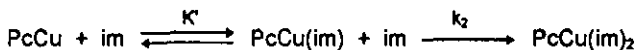
a) Une réaction trimoléculaire admettant une interaction simultanée de deux molécules d'imidazole avec la protéine:



b) Une réaction lente suivie d'un postéquilibre rapide:



c) Un prééquilibre rapide suivi d'une réaction lente :



La possibilité a) est en accord avec la dépendance au carré de la vitesse initiale et également avec le fait que la formation de l'intermédiaire peut être caractérisée par une constante d'équilibre dans laquelle la concentration d'imidezole intervient également au carré. Cette possibilité est cependant peu probable du fait de la rareté des réactions trimoléculaires.

La possibilité b) peut être exclue car, bien qu'expliquant la situation d'équilibre, elle ne tient pas compte de ce que la vitesse dépend du carré de la concentration en imidazole.

Concernant la possibilité c), la loi cinétique s'exprime de la manière suivante:

$$-\frac{d[\text{PcCu}]}{dt} = k_v [\text{PcCu}(\text{im})][\text{im}]$$

$$\text{de plus: } K' = \frac{[\text{PcCu}(\text{im})]}{[\text{PcCu}][\text{im}]} \text{ et si } [\text{im}] = C_{\text{im}}, \text{ on a: } K' = \frac{[\text{PcCu}(\text{im})]}{(C_{\text{Pc}} - [\text{PcCu}(\text{im})]) \cdot C_{\text{im}}}$$

$$\text{d'où: } [\text{PcCu}(\text{im})] = \frac{K' \cdot C_{\text{Pc}} \cdot C_{\text{im}}}{1 + K' \cdot C_{\text{im}}}$$

$$\text{et: } -\frac{d[\text{PcCu}]}{dt} = k_v \frac{K' \cdot C_{\text{Pc}} \cdot C_{\text{im}}^2}{1 + K' \cdot C_{\text{im}}}$$

On constate alors que cette loi cinétique devient identique à la loi expérimentale si $1 \gg K' \cdot C_{\text{im}}$.

Ces relations quantitatives permettent maintenant d'obtenir une image plus précise du déroulement de la réaction de séquestration du cuivre. En effet, on observe que le spectre de l'intermédiaire $\text{PcCu}(\text{im})_2$ a une forme pratiquement identique à celui de PcCu et que seulement son intensité diminue de 40% environ (Tableau 18). Ce qui suggère que le chromophore responsable de l'absorption à 597nm n'est que très peu modifié, c'est-à-dire que His 37 et His 87 sont remplacés par une molécule d'imidazole chacun. La deuxième réaction, nettement plus lente serait alors caractérisée principalement par la rupture de la liaison Cu-S-Cys 84, la liaison entre le cuivre et Met 92 étant beaucoup plus faible.

Comment alors expliquer d'un point de vue structurel les influences des mutations?

L12G, L12A et L12V montrent que l'accessibilité au chromophore est un critère important. La réduction de l'encombrement favorise l'accès pour l'imidazole.

Le seul encombrement aux environs du chromophore n'explique cependant pas tout. En effet, E68G, dont le poche hydrophobe est identique à celle de la Pc wt, montre des différences très importantes, de l'ordre d'une réduction complète de l'encombrement en

position 12, comme avec L12G. Le résidu glycine (-H) ne présentant pas d'encombrement, déstabilise le polypeptide, ce qui entraîne une moindre rigidité. Cette mutation associée à une réduction de l'encombrement en position 12 conduit à la protéine la moins stable de toutes: E68G L12A. Remarquons que d'une manière générale c'est le remplacement d'un acide aminé par glycine qui creuse les écarts de stabilité (Fig. 85 à 87). On peut ainsi distinguer deux groupes des mutants: les relativement stables (L12F, L12A et L12V) et les peu stables (E68G, L12G et E68G L12A) contenant tous une mutation en glycine. Ce n'est pas le seul cas où une mutation en glycine entraîne une perte de la structure et donc de l'activité d'une protéine. Le remplacement de la cystéine 73 de la thiorédoxine f d'épinard par glycine entraîne une très importante perte de l'activité de l'enzyme, alors que la mutation en alanine ou sérine conserve l'activité [88].

La stabilité de la plestocyanine en présence d'imidazole est donc régie par au moins deux paramètres importants: l'encombrement au site d'action de l'imidazole et le maintien de la structure de l'oprotéine.

6 Conclusion

Les modifications apportées à la plastocyanine ont été riches d'informations.

La position 12 a montré toute son importance dans le transfert d'électrons, comme fin contrôleur lors de la réduction de la plastocyanine avec les complexes $\{Co^{II}(alamp)\}$.

Les mutations semblent faciliter l'accès au site actif, ce qui est démontré par les mesures de stabilité en présence d'imidazole, et mettent en évidence l'importance de la géométrie des réactifs dans l'approche conduisant à la formation du précurseur qui précède le passage de l'électron.

Tous les résultats (transfert d'électrons, mesures de fixation et stabilité en présence d'imidazole) ont montré qu'une protéine doit être considérée dans son ensemble. La modification d'un résidu ne peut être discutée pour elle seule. Il faut prendre en considération non seulement la mutation du résidu mais aussi ses conséquences sur l'ensemble du polypeptide. Il devient alors plus délicat d'attribuer avec précision l'effet d'une mutation à un seul résidu plutôt qu'à ses conséquences sur la protéine.

Il faudra tenir compte de ce point pour la suite des investigations au sujet de la réduction de la plastocyanine. Il reste en effet plusieurs questions à éclaircir. Parmi celles-ci, je ne relèverai que celles qui ont été soulevées par le présent travail.

Quelle est la nature de l'équilibre entre Pc et Pc' ? L'investigation de cet équilibre est délicate avec les moyens spectrophotométriques utilisés jusqu'à présent. D'autres méthodes, comme la RMN, seront peut-être plus appropriées mais plus lourdes à utiliser. Reste que, si il s'avère possible de séparer par des méthodes chromatographiques les deux formes en équilibre, leur étude par les moyens utilisés jusqu'à présent sera suffisante.

Quelle est au cours de la réduction la participation des différents sites de TE ? Les mesures d'interruption de la réaction peuvent apporter beaucoup d'informations, si elles sont optimisées.

Quel est le rôle de la position occupée par Leucine 12 ? Les faibles variations de la vitesse du TE avec $[Co(promp)]$ en fonction des mutations en cette position, me fait penser à un rôle de support. La nature de la reconnaissance entre leucine 12 et $[Co(promp)]$ est selon moi de type hydrophobe. Le résidu isobutyl de leucine s'associerait avec le cycle proline

du ligand. Le remplacement de leucine 12 par un acide aminé polaire, comme sérine ou thréonine, devrait influencer négativement le TE avec [Co(promp)].

Qu'en est-il des deuxième et troisième sites de TE? Sont-ils vraiment deux? Le mutagenèse dirigée peut, en tentant de le modifier, situer le résidu responsable pour ces éventuels sites de TE. On peut envisager la mutation d'un bon nombre de résidus mais il ne faut pas pour autant négliger la variabilité des complexes que l'on peut utiliser pour la réduction de la plastocyanine. En effet, localiser un site ce n'est pas encore établir par quel mécanisme le complexe l'utilise. L'usage de différents complexes peut apporter les réponses à nos questions. Admettons par exemple un site aromatique, comme phénylalanine 35. Le complexe peut l'utiliser en se fixant via la sixième position à un groupement carbonyle d'une liaison peptidique ou en s'associant directement au résidu phénylalanine via le cycle pyridine du ligand par recouvrement des orbitales π . L'utilisation d'un complexe, dont le cycle pyridine du ligand serait remplacé par le cycle pipéridine, pourrait appuyer l'une ou l'autre hypothèse de mécanisme.

Reppelons enfin que c'est en poursuivant une étude, faisant varier protéines et complexes, qu'une approche combinée des questions est maintenue et c'est elle qui est la plus susceptible d'apporter des réponses (cf. Introduction).

7 Résumé

Le but de ce travail est de clarifier au moyen de la mutagenèse dirigée le mécanisme des interactions stéréosélectives dans le transfert d'électrons entre la plastocyanine et des complexes optiquement actifs de cobalt(II).

Ce travail de thèse comprend donc deux parties. La première partie - de biologie moléculaire et de biochimie - décrit la création de mutants de la plastocyanine. La deuxième partie - chimique - comprend les études cinétiques de transfert d'électrons et de stabilité des protéines produites vis-à-vis l'imidazole.

Le chapitre 1 présente une introduction générale sur la plastocyanine, son rôle biologique, sa structure et ses propriétés physico-chimiques, et donne des informations au sujet de la biologie moléculaire de la plastocyanine et de l'azurine. Dans le même chapitre se trouve la description des ligands et des complexes de cobalt(II) utilisés comme réactifs dans les réactions de transfert d'électrons.

Le chapitre 2 présente les techniques de génie génétique et de génie des protéines; d'une manière générale d'abord, plus détaillée ensuite pour les techniques utilisées dans ce travail.

Les résultats de mutagenèse dirigée, de l'expression et de purification des plastocyanines recombinantes forment le contenu du chapitre 3. Il y est montré que l'expression de la plastocyanine dans un système procaryotique nécessite l'ajout du peptide signal de l'azurine au gène de la plastocyanine. Le réunion des deux fragments d'ADN (le premier codant pour le peptide signal (Az) et le second pour la plastocyanine (Pc)) a été effectué par PCR et megaprimer. Cette même technique a été utilisée pour la mutagenèse dirigée, huit clones ont été ainsi synthétisés: AzPc wt, AzPc L12G, AzPc L12A, AzPc L12V, AzPc L12F, AzPc E68G, AzPc E68G L12G et AzPc E68G L12A. A partir de ces clones, sept protéines ont été produites: Pc wt, Pc L12G, Pc L12A, Pc L12V, Pc L12F, Pc E68G et Pc E68G L12A, en effet le clone AzPc E68G L12G n'a pas donné de protéine fonctionnelle. Le peptide signal conduit la protéine dans l'espace périplasmique d'*E. coli* et est ensuite détaché. Dès lors la purification de la plastocyanine débute par un choc osmotique, séparant la fraction périplasmique du reste de la bactérie. La suite de la purification s'appuie consécutivement sur trois critères: l'hydrophobicité, la taille et la charge de la plastocyanine. Ce chemin de purification conduit à une protéine pure (rapport $A_{277} / A_{697} \approx 1$) et une perte relative globale d'environ 50%.

Le chapitre 4 est consacré à l'étude des réactions de transfert d'électrons entre les différentes plastocyanines et les complexes de cobalt(II): $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ et $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$. Il en résulte que l'ensemble des mutations n'affecte que très peu le comportement avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ alors que des différences importantes sont observées avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$. Ces dernières ont permis de discuter l'importance de la position leucine 12 dans le contrôle de l'accès au site de transfert d'électrons. Cette importance est corroborée par les mesures du taux de fixation du complexe $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})]^+$ suite au transfert d'électrons. Ces mesures confirment l'existence de deux sites de transfert d'électrons comme pour la protéine native, l'un via histidine 87 suivant un mécanisme sphère interne, l'autre suit un mécanisme sphère externe par un chemin encore inconnu. Le comportement biphasique tout à fait particulier des mutants Pc L12A, Pc E68G et Pc E68G L12A lors du transfert d'électrons avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ a permis de supposer un équilibre entre deux formes de plastocyanine Pc et Pc'. Le cas particulier de Pc L12F laisse supposer l'existence d'au moins trois sites pour le transfert d'électrons. En effet, si les réactions de transfert d'électrons avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ ne sont pas influencées par cette mutation, celles avec $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ ne montrent plus de stéréosélectivité cinétique, bien que la répartition des deux énantiomères, sur les deux sites utilisés par ce complexe, n'est pas égale. On en déduit donc la possibilité que trois sites se trouvent dans le poche hydrophobe de la plastocyanine. Un est connu, c'est celui qui par un mécanisme sphère interne conduit à la fixation du complexe oxydé $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})]$ sur l'histidine 87. Un deuxième, utilisé par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-alamp}]$ et qui doit se trouver relativement proche du premier, conduit à un produit non fixé: Δ - $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{R,R})\text{-alamp}]\text{H}_2\text{O}]^+$. Le troisième site, plus éloigné, est utilisé par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})]$ et conduit à l'aqua-complexe de cobalt(III): $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]^+$.

Par analogie aux études cinétiques de l'extraction du cuivre par des petits ligands comme l'imidazole, l'influence des mutations sur la stabilité des plastocyanines recombinantes est décrite dans le chapitre 5. On trouve que la perte du Cu^{2+} suit globalement le même mécanisme que celui trouvé pour la protéine native, mais que la stabilité des mutants est réduite. Ceci est particulièrement le cas pour les mutants contenant un résidu glycine, L12G, E68G, E68G L12A, expliquant ainsi pourquoi la protéine double mutée E68G L12G, bien qu'elle soit exprimée dans *E. coli*, n'est plus en mesure de lier un Cu^{2+} .

Bibliographie

- [1] B. Vennesland, in *"Topics in Current Chemistry"* 48, p. 39-66, Springer Verlag, Berlin, (1974)
- [2] K. Bernauer, J.-J. Seuvalin, *Chem. Soc., Chem. Commun.* 353 (1988)
- [3] K. Bernauer, P. Jauslin, *Chimia*, 47: 218, (1993)
- [4] K. Bernauer, J.-J. Sauvain, P. Schürmann, V. Viette, *Helv. Chim. Acta*, 73: 346, (1990)
- [5] L. Verardo, "Stéréosélectivité cinétique et reconnaissance chirale dans la réaction de transfert d'électrons entre la plastocyanine d'épinard et des complexes de Cobalt(II)." -Travail de thèse- Institut de chimie, Université de Neuchâtel, (1996)
- [6] E.T. Adman, *Adv. Protein Chem.* 42: 145, (1991)
- [7] W. Haenal, in *"Encyclopedia of Plant Physiology"* 19, p. 547-559, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (1986)
- [8] S. Katoh, A. Takamiya, *Natura*, 189: 1665, (1961)
- [9] D. Boulter, *Intl Rev Biochem*, 13: 1, (1977)
- [10] J.M. Guss, H.C. Freemenn, *J. Mol. Biol.* 169: 521, (1983)
- [11] A.G. Sykes, *Chem Soc Rev*, 14: 283, (1985)
- [12] A.G. Sykes, *Struct Bond*, 75: 175, (1991)
- [13] L.M. Briggs, V.L. Pecoraro, L. McIntosh, *Plant Molecular Biology*, 15: 633, (1990)
- [14] G. Hauska, R.E. Mc Carty, R.J. Berzborn, E. Racker, *J. of Biol. Chem.*, 248: 3524, (1971)
- [15] S. Katoh, A. Takamiya, *Biochimica et Biophysica Acta*, 4: 335, (1963)
- [16] S. Katoh, I. Shiratori, A. Takamiya, *J Biochem*, 51: 32, (1962)
- [17] G. Sandmann, P. Börger, in *"Encyclopidia of plant physiology"* 15, p. 563-596, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, (1983)
- [18] R.M. Wynn, R. Melkin, *Biochemistry*, 27: 5863, (1986)
- [19] L.G. Gross, *Photosynthesis Research*, 37: 103, (1993)
- [20] E. Frieden, "Metal Ions In Biological Systems", Marcel Dekker Inc. editor. 1ère ed. New York, (1981)

- [21] E.I. Solomon, J.W. Hare, D.M. Dooley, J.H. Dewson, P.J. Stephens, H.B. Grey, *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 168, (1980)
- [22] M.D. Sanderson, L.B. Anderson, E.L. Gross, *Biochimica et Biophysica Acta*, **852**: 269, (1986)
- [23] M.D. Scawen, E.J. Hewitt, D.M. James, *Phytochemistry*, **14**: 1225, (1975)
- [24] J.M. Guss, H.D. Bartunik, H.C. Freemann, *Acte Crystallogr.* **B48**: 790, (1992)
- [25] J.M. Guss, P.R. Herrowell, M. Murate, V.A. Norris, H.C. Freemann, *J. Mol. Biol.* **192**: 361, (1986)
- [26] T.P.J. Garrett, D.J. Clingeffer, J.M. Guss, S.H. Rogers, H.C. Freemann, *J Biol Chem*, **169**: 2822, (1984)
- [27] W.B. Church, J.M. Guss, J.J. Potter, H.C. Freemann, *J Biol Chem*, **261**: 234, (1966)
- [28] C.A. Collyer, J.M. Guss, Y. Sugimure, F.Y. Yoshizaki, H.C. Freemann, *J. Mol. Biol.* **211**: 617, (1990)
- [29] J.M. Moore, D.A. Case, W.J. Chazin, G.P. Gippert, T.F. Hevel, R. Powls, P.E. Wright, *Science*, **240**: 314, (1988)
- [30] J.M. Moore, C.A. Lepre, G.P. Gippert, W.J. Chazin, D.A. Case, P.E. Wright, *J. Mol. Biol.* **221**: 533, (1991)
- [31] J.W. Hare, E.I. Solomon, H.B. Grey, *Science*, **240**: 314, (1988)
- [32] A.G. Lappin, M.G. Segal, D.C. Weatherburn, A.G. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 2297, (1979)
- [33] P.M. Colman, H.C. Freemann, J.M. Guss, M. Mureta, V.A. Norris, J.A.M. Remshaw, M.P. Venkateppa, *Nature*, **272**: 319, (1978)
- [34] D.R. Ort, B.A. Melandri, in *"Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria."* **1**, p. 537-588, Academic press Inc. New york, (1982)
- [35] J.D. Sinclair-Day, M.J. Sisley, A.G. Sykes, G.C. King, P.E. Wright, *J Chem Soc Chem commun.* : 505, (1985)
- [36] L. Morpugo, G. Rotilio, A. Finazzi-Agro, B. Mondovi, *Arch. Biochem. Biophys.* **161**: 291, (1996)
- [37] R.H.L. Merks, R.D. Miller, *Arch. Biochem. Biophys.* **195**: 103, (1979)
- [38] P.M. Wood, *Biochimica et Biophysica Acta*, **357**: 370, (1974)
- [39] M.A. Augustin, S.K. Chapman, A.G. Sykes, S.H. Speck, E. Margoliash, *J. of Bio. Chem.*, **258**: 6405, (1983)

- [40] G.W. Centers, G. Gilerdi, *FEBS*, **325**, number 1,2: 39, (1993)
- [41] G. Tollin, T.E. Meyer, G. Cheddar, E.D. Getzloff, M.A. Cuzanovitch, *Biochemistry*, **26**: 3361, (1986)
- [42] S. He, S. Modi, D.S. Bendall, J.C. Gray, *EMBO J.* **250**: 280, (1991)
- [43] S. Modi, M. Nordling, L.G. Lundberg, D. Hansson, D.S. Bendell, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1102**: 85, (1992)
- [44] R. Durley, L. Chen, L.W. Lim, F.S. Marhews, V.L. Davidson, *Protein Sci.* **2**: 739, (1993)
- [45] M.R. Redindo, D. Cascio, M.K. Choukeir, D. Ricø, S. Merchant, T.D. Yeates, *Biochemistry*, **32**: 10560, (1993)
- [46] D. Becku-Betts, S.K. Chepmen, C.V. Knox, A.G. Sykes, *inorg. Chem.* **24**: 1677, (1985)
- [47] G.P. Anderson, D.G. Senderson, C.H. Lee, S. Durall, L.B. Anderson, E.L. Gross, *Biochimica et Biophysica Acta*, **894**: 386, (1987)
- [48] M. Nordling, L.G. Lundberg, *FEBS*, **291**, number 2: 327, (1991)
- [49] K. Sigfridsson, Ö. Hansson, B.G. Kerlsson, L. Baltzer, M. Nordling, L.G. Lundberg, *Biochim. Biophys. Acta Bio-Energetics*, **1228**: 28, (1995)
- [50] J.J. Sauvain, "Stéréosélectivité et mécanisme de la réduction de la plestocycénine de l'épinard par des complexes optiquement actifs de fer (II) et de cobalt (II)" -Travail de thèse- Institut de chimie, Université de Neuchâtel, (1990)
- [51] H. Stoeckli-Evens, L. Brehm, P. Poussez, K. Bernauer, H.B. Bürgi, *Helv. Chim. Acta*, **68** (1985)
- [52] C. Rother, T. Jancen, A. Tyagi, J. Tiltgen, R.G. Hermann, *Curr. Genet.* **11**: 171, (1986)
- [53] G. von Heijne, J. Steppuhn, R.G. Hermann, *Eur. J. Biochem.* **180**: 535, (1989)
- [54] T. Hibino, B.H. Lee, T. Tekebe, *J. Biochem. (Tokyo)*, **116**: 826, (1994)
- [55] T.G. Knott, C. Robinson, *J Biol Chem*, **269**: 7843, (1994)
- [56] R.H.A. Arvidson, M. Nordling, L.G. Lundberg, *Eur. J. Biochem.* **179**: 195, (1989)
- [57] J. Brosius, M. Erfle, J. Storelle, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**: 3539, (1985)
- [58] F.W. Studier, A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, J.W. Dubendorf, in *"Methods in Enzymology"* **185**, p. 60-89, Academic Press, Inc. New York, (1990)

- [59] W.H. Campell, G. Gowri, *Plant Physiology*, **92**: 1, (1990)
- [60] J. Sambrook, E. Fritsch and T. Maniatis, "Molecular cloning: A laboratory manual", Nolan C, editor. 2^{ème} ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989)
- [61] E. Amann, B. Ochs, K.-J. Abei, *Gene*, **69**: 301, (1988)
- [62] D.G. Pitcher, N.A. Saunders, R.J. Owen, *Letters in Applied Microbiology*, : 151, (1989)
- [63] J.B. Cooper, D.L. Halverson, C. Coldren, *Nucleic Acids Research*, **21**: 1681, (1993)
- [64] D. Hanahan, in "DNA Cloning, A Practical Approach" p. 109-135, IRL Press Limited, Oxford, (1987)
- [65] "fmol DNA Sequencing System. Technical Manual", Promega, (1992)
- [66] B.G. Karlsson, T. Pascher, M. Nordling, & el, *FEBS LETTERS*, **246**: 211, (1989)
- [67] T.K. Chang, S.A. Iverson, S.A. Rodrigues, C.N. Kiser, A.Y.C. Lew, & el, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 1325, (1991)
- [68] W. Haehnel, T. Jansen, K. Gause, R.B. Klösigen, B. Stahl, D. Michl, B. Huvermann, M. Karas, R.G. Herrmann, *The EMBO Journal*, **13**, No 5: 1028, (1994)
- [69] M. Nordling, T. Olausson, L.G. Lundberg, *FEBS LETTERS*, **276**: 98, (1990)
- [70] Z.B. Orgel, M. McPherson, *Protein Engineering*, **5**: 467, (1992)
- [71] D. Baretino, M. Feigenbutz, *Nucleic Acids Research*, **22**: 541, (1994)
- [72] N.G. Nossal, L.A. Heppel, *J Biol Chem*, **241**: 3055, (1966)
- [73] S.G. Mayhew, L.G. Howell, *Analytical Biochemistry*, **41**: 466, (1971)
- [74] U.K. Laemmli, *Nature*, **227**: 680, (1970)
- [75] E. Gaymard, "Clonage et expression de la ferrédoxine: thiorédoxine réductase des chloroplastes d'épinard" -Travail de thèse- Institut de biologie, Université de Neuchâtel, (1996)
- [76] P.M. Schenk, S. Baumann, R. Mettes, H.-H. Steinbiss, *BioTechniques*, **19**: 196, (1995)
- [77] Maegert, S. -Travail de Diplôme- Institut de chimie, Université de Neuchâtel, (1990)
- [78] H. Teube, H. Meyers, R.R. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 4118, (1953)
- [79] O. Farver, I. Pecht, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 4190, (1981)
- [80] O. Farver, I. Pecht, *Coordination Chemistry Reviews*, **94**: 17, (1989)

- [81] K. Bernauer, L. Verardo, *Angew. Chem.* **108**: 1823, (1996)
- [82] H.J. Hilgers, "Kinetik, Stereoselectivität und Reaktionsmechanismus des Elektrontransfers zwischen Kobalt(III)- und Eisen(II)-Komplexen optisch aktiver Liganden" -Travail de thèse- Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, (1995)
- [83] G.W. Evens, *Physiol. Rev.* **53**: 535, (1973)
- [84] M.I. Harris, J.E. Coleman, *Journal of Biological Chemistry*, **243**: 5063, (1968)
- [85] H. Bohner, H. Böhme, P. Böger, *FEBS*, **131**: 386, (1981)
- [86] J.K. Reyton, E.D. Harris, *Journal of Biological Chemistry*, **254**: 621, (1996)
- [87] J.J.R. Faustro de Silva, R.J.P. Williams, *Struct Bond*, **29**: 67, (1971)
- [88] G. Del Vel, "Etudes des structures et fonctions des thiorédoxines chloroplastiques d'épinard par des approches moléculaires." -Travail de thèse- Institut de biologie, Université de Neuchâtel, (1996)

Protocole sur cinq jours de la production de la plastocyanine dans *E. coli*.

Transformer les bactéries compétentes avec le plasmide pes plus de 48 heures avant la préculture.

1^{er} Jour Lancer préculture dans 500ml de milieu:

TB:	Tryptone	6 g	tampon:	KH ₂ PO ₄	1.155g
	Yeast	12 g		K ₂ HPO ₄	6.27g
	Glycérol	2 ml		Eau	50 ml
	Eau	450 ml		à autoclaver séparément !	

+ 1000 µl Ampiciline (50 mg/ml) à 37°C et 250 rpm, over night.

Préparation du milieu de culture dans le fermenteur:

TB:	Tryptone	120 g	tampon:	KH ₂ PO ₄	23.1g
	Yeast	240 g		K ₂ HPO ₄	125.4g
	Glycérol	40 ml		Eau	1000 ml
	Eau	9 litres		à autoclaver séparément !	

Stérilisation de l'ensemble in situ: Agitation 1000 rpm

ATTENTION: ajouter 1 bar de surpression dans la sonde à pH (avec la pompe à vélo).
5 minutes à ~100°C, puis fermer les vannes.
30 minutes à 121°C,
puis à ~100°C ouvrir la vanne de sortie d'air.

2^e Jour Culture: 10l TB+ 20 ml Ampiciline (50 mg/ml)
+ 10 ml CuSO₄ 1M

Conditions: température: 37°C; agitation: 500 rpm et aération: 15 litres/min.

D.O. = 1 - 2 : induction avec ~ 2,5 g IPTG (= 1mM final)

Croissance jusqu'à une D.O. de 20 à 30, 6 à 8 heures après l'induction ou lorsque le pH remonte jusqu'à 7.5 - 8.

Montage de la centrifugation en continu dans la centrifugeuse Sorvall.

Centrifugation:	vitesse:	12'000 rpm (rotor SS-34)
	température:	10°C
	débit:	~ 300 ml/min

Egouter et nettoyer les tubes, déterminer le poids frais des cellules et les conserver à 4°C

Couler une colonne DEAE de 200 ml de résine tassée. Faire une suspension claire de résine afin de ne pas trapper de bulles d'air et avant de couler décanter pour éliminer les fines particules.

Equilibrer avec 1-2 litres (~ 5 volumes de colonne) de tampon 50 mM Tris-Cl pH 7.3 et 70% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (436 g +1l de tampon).

3^e Jour Choc osmotique: 800 ml de Solution A: 20% Saccharose (160 g)
30 mM Tris-Cl pH 8 (24 ml de 1M)
dens H₂O Mili-Q

800 ml de Solution B: 0,5 mM MgCl₂ (400 µl de 1M)
1 mM CuSO₄ (800 µl de 1M)
dens H₂O Mili-Q à ~ 4°C

Resuspendre à l'aide d'un tube de pouter délicatement et de manière homogène les cellules dans la solution A. Placer cette suspension dans un erlen d'1 litre avec un gros barreau magnétique et une faible agitation à température ambiante pendant 20 minutes.

Centrifuger à 7'000 rpm (rotor GSA) 15 minutes à 4°C.

Resuspendre rapidement à la manière d'un shaker le culot dans la solution B, jusqu'à une suspension homogène. Placer cette suspension dans un erlen d'1 litre avec un gros barreau magnétique et une faible agitation dans un bec de glace pendant 20 minutes.

Centrifuger à 12'000 rpm (rotor GSA) 20 minutes à 4°C.

Récupérer le surnageant dans un cylindre gradué.

Ajouter à la fraction périplasmique: 1/20 de 1M Tris-Cl pH 7,3 (~50mM final) et relever le volume.

Précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70% : 436 mg / ml de fraction périplasmique.

Centrifugation: GSA 13'000 rpm (rotor GSA), 10 min, 4°C, filtrer sur 4 couches de gezel

Charger DEAE sur la pailleuse en chambre froide et lever avec 1 l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%.

a) DEAE sur Frac 300: Elution avec un saut à 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

Programme: Rack mode et Volume

1^{er} rack: tube 3; X pulses; 1 fraction (un bec = volume mort moins 10ml)

$$X = \frac{(r^2 \cdot \pi \cdot L) - 10}{0,44} = \text{nombre de pulses du 1^{er} rack}$$

L = longueur de résine (cm)

r = rayon de la colonne (cm)

0,44 = volume en ml d'une pulse, selon les conditions de la pompe P-1 (Cf. page suivante).

2^e au 4^e rack: tube 2; 24 pulses; 20 fractions (60 tubes au total)

Pompe P-1: 125 ml/h; tuyau de Ø 2.1 mm, x10, setting 4.
Moniteur UV: Absorbance de 2 (trace bleue)
Traceur: défilement 0.17 pulse / cm ; Absorbance de 1 (trace rouge)

b) DEAE sur LKB Ultrotrack: Elution avec un seut à 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

100 ml/h: Perpex 3/10, tuyau Ø 1,3 mm;
3 min/fraction, 80 fractions
traceur W+W: 4cm/h.

Equilibrer G-50 avec 1 litre de 20 mM Tris-Cl pH 7,3 (20ml/l de 1M) + 50 mM NaCl (2.89 g/l).

4^e Jour:

Réunir les fractions issues de le DEAE, contenant la plestocyanine en fonction de la couleur bleue.

Spectre UV/Vis de 250 à 700 nm, noter le volume.

Concentrer sur YM 3, jusqu'à moins de 10 ml. Très longue concentration !

Centrifugation: 30 min, 20'000 rpm (rotor SS-34), 4°C et filtration à 0.22µm avec un filtre MILLEX

Charger colonne G-50: LKB Ultrotrack
25 ml/h: Perpex 3/100, tuyau Ø 1,15 mm;
12 min/fraction, 80 fractions
traceur W+W: 1cm/h.

ou:

Frac 300 Reck mode et Volume
Pompe P-1: 10x setting 2.5, tuyau Ø 1,3 mm

tube 2 , 38 pulses, 80 fractions
traceur 0.085 pulse/cm

Monter et équilibrer Q-Hiload sur FPLC

5^e Jour

Réunir les fractions G-50, contenant la plestocyanine en fonction de la couleur bleue.

Spectre UV/Vis de 250 à 700 nm, noter le volume.

Concentrer sur YM 3, jusqu'à moins de 50 ml.

Centrifugation: 30 min, 20'000 rpm (rotor SS-34), 4°C et filtrer à 0.22 µm avec un filtre MILLEX.

Q-Hiloed: methode Q-HILOAD (Cf. Annexe 2)

Solutions: 3l 20mM Tris pH 7.3 (tempon A)
 1l 20mM Tris pH 7.3 + 1M NaCl (tampon B)
 500ml 20mM Tris pH 7.3 + 2M NaCl (cleaning)
 500ml 20mM Tris pH 7.3 + 20% EtOH (storage)

Réunir les fractions du 1^{er} pic en fonction du rapport $A_{277}/A_{597} \approx 1 \pm 0,2$.

Noter le volume et spectre UV/Vis de 250 à 750 nm.

Concentrer jusqu'à $A_{597} = 2-5$ et diafiltrer sur YM 3 avec un tempon phosphate 100 mM pH 7,0 (KH_2PO_4 et K_2HPO_4).

Spectre 250 à 700 nm, dans les cuvettes de 1mm.

Aliquoter X ml / tube:

$$X = \frac{5\text{ml} \cdot 0,4}{A_{597 \text{ concentrée}}}, \text{ pour avoir 5ml de Pc à } A_{597} = 0,4$$

et congeler é - 20°C.

LCC-500 methods

Name = EQUILIBRATE Number = 0

Set pressure limit to 0.3 MPaI

ml	Instructions		Comments
0.0	VALVE.POS	2.8	
0.0	VALVE.POS	1.3	
0.0	VALVE.POS	5.3	
0.0	CONC%B	0	
0.0	ML/MIN	1	
1.0	VALVE.POS	5.1	
60.5	ML/MIN	5	Increase flow rate
300.0	CONC%B	0	
	END METHOD		

Name = SEPARATE Number = 1

Set pressure limit to 0.3 MPaI

ml	Instructions		Comments
0.0	VALVE.POS	2.8	
0.0	VALVE.POS	1.3	
0.0	VALVE.POS	5.3	
0.0	CONC%B	0	
0.0	ML/MIN	1	
1.0	VALVE.POS	5.1	
1.1	ML/MIN	5	
2.9	ML/MIN	1	
3.0	VALVE.POS	5.2	Inject sample
3.0	CM/ML	0.02	Start recorder, 50 ml/cm
3.0	CLEAR DATA		
3.0	MONITOR	1	
3.0	LEVEL%	5	
3.0	ML/MARK	50	Plotter 50 ml/cm
3.0	INTEGRATE	1	
3.1	ML/MIN	3	
47.1	ML/MIN	1	
52.2	VALVE.POS	5.1	
52.3	ML/MIN	5	
59.2	CONC%B	0	
209.2	PORT.SET	6.1	
749.2	CONC%B	30	
749.2	PORT.SET	6.0	
749.2	CONC%B	100	Strip
809.2	CONC%B	100	
	END METHOD		

Name = CLEAN-EtOH Number = 2

Cleaning run with 2 M NaCl (Buffer B in Pump B). Buffer in Pump A. Storage in 20% EtOH.

Set pressure limit to 0.3 MPaI

ml	Instructions	Comments
0.0	VALVE.POS	2.8
0.0	VALVE.POS	1.3
0.0	VALVE.POS	5.3
0.0	CONC%B	0 Rinse with Buffer A
0.0	ML/MIN	1
0.2	WASH A.B	0.1 Change with 2 M NaCl
1.0	VALVE.POS	5.1
1.5	ML/MIN	1
2.0	CONC%B	100 Clean with 2 M NaCl
300.0	CONC%	B100
300.0	CONC%B	0 Equilibrate
400.0	CONC%B	0
400.0	VALVE.POS	5.3
400.0	PORT.SET	4.1
400.1	WASH A.B	0.1 Change with 20% Ethanol
400.1	VALVE.POS	5.1
400.1	ML/MIN	0.5
400.1	CONC%B	100 Store in Ethanol
460.1	CONC%B	100
	END METHOD	

LCC-500 methods

Name = SEPARATION Number = 1

Set pressure limit to <1 MPa and deactivate pulse compensation!

ml	Instructions	
0.0	CONC%B	0.0
0.0	ML/MIN	0.20
0.0	VALVE.POS	1.3
0.0	VALVE.POS	2.8
0.0	VALVE.POS	3.6
0.1	ML/MIN	2.0
1.0	VALVE.POS	1.2
1.0	CM/MIN	0.50
1.0	CLEAR DATA	
1.0	MONITOR	1
1.0	LEVEL%	2.0
1.0	MIN/MARK	1.0
1.0	INTEGRATE	1
1.0	PORT.SET	6.1
3.0	VALVE.POS	1.1
6.0	MIN/MARK	0.0
7.0	PORT.SET	6.0
7.0	ML/MIN	2.00
7.0	CM/MIN	0.10
27.0	CONC%B	0.0
	END METHOD	

Name = CLEANSTORE Number = 2

Set pressure limit to <1 MPa and deactivate pulse compensation!

Pump A = 0.1 M NaOH, Pump B = Milli Q + 0.05 % NaAzide

ml	Instructions	Comments
0.0	CONC%B	0
0.0	ML/MIN	0.5
0.1	VALVE.POS	1.3
0.1	VALVE.POS	2.8
0.1	VALVE.POS	5.3
0.2	WASH A.B	1.1
0.3	VALVE.POS	3.6
0.3	VALVE.POS	1.1 Clean with 0.1 M NaOH
0.4	ML/MIN	1.0
20.0	CONC%B	0
20.0	CONC%B	100 Equilibrate with H2O + Azida
20.0	ML/MIN	2.5
40.0	CONC%B	100
	END METHOD	

Pharmacie LKB Biotechnology

FPLCmenager™

METHOD SUPERDEX.75

COLUMN: Superdex 75 HR 10/30

Eluent: 100 mM phosphete buffer pH 7.0

Sample: 200 µl injected through MILLEX

CONFIGURATION

Control unit: LCC-500

CONTROL: LCC-500 monitor1: UV-1
monitor2: GRADIENT

PUMPS A,B: P-500

C: FOR SAMPLE LOADING INTO LOOP

VALVES: 2.8 Flow to injection valve

1.1 Injection valve

3.2 Flow from Sup-12 to UV-1

MONITOR: UV-1 wavelength : 280 nm cell: 1 cm
AUFS: 0.1RECORDER: 482
channel 1: ABSORBANCE
channel 2: GRADIENTFRAC-100: Fraction 1.0 ml, Peak 1.0 ml, Level 2%, Mode 12,
Delay 0.18, Cal 109.3

CALIBRATION

Base : ML
Pump A,B : 110.00 (Pulses / 0.1ml , 0.1dl)
Pump C : 285.00 (Pulses / 0.1ml , 0.1dl)
Recorder : 200.00 (Pulses / 0.1 cm)

Chromatogram parameters

range monitor 1: 10 (mV / 100%)
monitor 2: 1000 (mV / 100%)
aquisition rate: 120.00 (Points / min)Default start LCC-500 method: 1 in bank: #
Start data acquisition at: 2.00 (ML)

LCC-500 methods

Name = EQUILIBRATE Number = 0

Set pressure limit to 1.5 MPa end disable pulse compensation!

ml	Instructions	Comments
0.0	CONC%B	0
0.0	ML/MIN	0.5
0.1	VALVE.POS	1.3
0.1	VALVE.POS	5.3
0.1	VALVE.POS	2.8
0.2	WASH A.B	0.1 Buffer change in pump A
0.9	VALVE.POS	3.2
0.9	VALVE.POS	1.1
1.0	ML/MIN	1.0
50.0	CONC%B	0
	END METHOD	

Name = SEPARATE

Number = 1

Set pressure limit to 1.5 MPa and disable pulse compensation !

ml	Instructions	Comments
0.0	CONC%B	0
0.0	ML/MIN	0.5
0.0	VALVE.POS	1.3
0.3	VALVE.POS	2.8
0.3	VALVE.POS	3.2
0.5	ML/MIN	1.0
2.0	VALVE.POS	1.2 Sample injection
2.0	CLEAR DATA	
2.0	MONITOR	1
2.0	LEVEL%	2
2.0	INTEGRATE	1 Start data acquisition
3.0	VALVE.POS	1.1
7.0	CM/ML	0.50 Start recorder
7.0	ML/MARK	1.0 and printer
26.0	CM/ML	0.00 Stop recorder
26.0	INTEGRATE	0 Print results
27.0	CONC%B	0
	END METHOD	

Name = CLEANSTORE

Number = 9

Set pressure limit to 1.5 MPa and disable pulse compensation!

Pump A = 0.5 M NaOH, Pump B1 = H₂O Milli Q, Pump B2 = 20% EtOH

ml	Instructions	Comments
0.0	CONC%B	0.0 (0.5 M NaOH)
0.0	ML/MIN	0.5
0.1	VALVE.POS	1.3
0.1	VALVE.POS	5.3
0.1	VALVE.POS	2.8
0.2	WASH A.B	1.1 Buffer change in pumps
0.5	VALVE.POS	3.2
0.5	VALVE.POS	1.1
25.0	CONC%B	0.0
25.0	CONC%B	100 (H ₂ O milli Q)
50.0	PORT.SET	4.1 20% EtOH
50.0	VALVE.POS	1.3
50.1	WASH A.B	0.1 pump B: change 20% EtOH
50.2	VALVE.POS	1.1 = 20% EtOH
100.0	CONC%B	100
	END METHOD	

Pharmacia LKB Biotechnology

FPLCmaneger™

METHOD MONO-Q.MET

COLUMN: Mono Q HR 5/5

Sample preparation: centrifugated 12k 15' end filtered through MILLEX

Eluent A: 20 mM Tris-Cl pH 7.3

Preparation: filtered through 0.22 micron, degassed

Eluent B: 20 mM Tris-Cl pH 7.3, 1 M NaCl

Preparation: filtered through 0.22 micron, degassed

CONFIGURATION

Control unit: LCC-500

Column attached between VALVE #1.3 and #3.3

Replece constriction tube with larger diameter tubing between monitor end FRAC-100

CONTROL: LCC-500 monitor1: UV-1
monitor2: GRADIENT

PUMPS A,B: P-500

MONITOR: UV-1 wavelength : 280 nm cell: 1 cm
AUFS : 2RECORDER: 482 channel 1: ABSORBANCE
channel 2: GRADIENTFRAC-100: Mode 13; Fraction Vol. 4.0 ml; Peak Volume 3.0 ml
Delay 0.18 ; Level 5 %

CALIBRATION

Base : ML

Pump A,B : 110.00 (Pulses / 0.1ml , 0.1dl)

Pump C : 285.00 (Pulses / 0.1ml , 0.1dl)

Recorder : 200.00 (Pulses / 0.1 cm)

Chromatogram peremeters:

range monitor 1 : 10 (mV / 100%)

monitor 2 : 1000 (mV / 100%)

equisition rate : 15.00 (Points / min)

Default start LCC-500 method : 1

Start data acquisition at : 0.1 (ML)

LCC-500 methods

Name = EQUILIBRATE Number = 0

Remove 20% EtOH and equilibrate with start buffer.

ml	Instructions	Comments
0.0	CONC%B	0.0
0.0	ML/MIN	0.50
0.0	VALVE.POS	1.3
0.0	VALVE.POS	2.8
0.0	VALVE.POS	3.3
0.0	VALVE.POS	5.3
0.1	WASH A.B	1.1
0.2	VALVE.POS	5.1
0.3	ML/MIN	2
5.0	CONC%B	0.0
5.0	CONC%B	100
15.0	CONC%B	100
15.0	CONC%B	0.0
20.0	CONC%B	0.0
	END METHOD	

Name = SEPARATE Number = 1

General Separation Method

ml	Instructions	Comments
0.0	CONC%B	0.0
0.0	ML/MIN	0.50
0.0	VALVE.POS	1.3
0.0	VALVE.POS	2.8
0.0	VALVE.POS	3.3
0.2	ML/MIN	2
1.0	CM/ML	0.50
1.0	PORT.SET	6.0
1.0	VALVE.POS	5.2
1.0	CLEAR DATA	
1.0	MONITOR	1
1.0	LEVEL%	5.0
1.0	ML/MARK	1
1.0	INTEGRATE	1
3.0	VALVE.POS	5.1
5.0	CONC%B	0.0
45.0	CONC%B	40
45.0	CONC%B	100
47.0	ML/MIN	2
47.0	CM/ML	0.00

```

47.0  PORT.SET  6.0
47.0  ML/MARK  0.0
50.0  CONC%B   100
50.0  CONC%B   0
55.0  CONC%B   0
      END METHOD

```

Name = ISOCRATIQUE Number = 2

Isocratic Gradient Separation Method

ml	Instructions	Comments
0.0	CONC%B	0.0
0.0	ML/MIN	0.50
0.0	VALVE.POS	1.3
0.0	VALVE.POS	2.8
0.0	VALVE.POS	3.3
0.2	ML/MIN	2
1.0	CM/ML	0.50
1.0	PORT.SET	6.1
1.0	VALVE.POS	5.2
1.0	CLEAR DATA	
1.0	MONITOR	1
1.0	LEVEL%	
1.0	ML/MARK	1
1.0	INTEGRATE	1
3.0	VALVE.POS	5.1
5.0	CONC%B	0.0
20.0	CONC%B	15
45.0	CONC%B	15
45.0	CONC%B	100
47.0	ML/MIN	2
47.0	CM/ML	0.00
47.0	PORT.SET	6.0
47.0	ML/MARK	0.0
50.0	CONC%B	100
50.0	CONC%B	0
55.0	CONC%B	0
	END METHOD	

Start of Isocratic Gradient