

Université de Montréal

DÉTERMINATION DU MÉCANISME CATALYTIQUE DE
L'ALDOLASE DU MUSCLE DE LAPIN RECOMBINANTE À
PARTIR DE L'ÉTUDE STRUCTURALE ET CINÉTIQUE
DE CERTAINS DE SES MUTANTS

Thèse présentée par
Amal Maurady

Département de Biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue
de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)
en Biochimie

Mai 1999

©Maurady Amal, 1999



W
4
U58
2000
v. 055



Université de Montréal
Faculté de médecine

Thèse intitulée

Détermination du mécanisme catalytique
de l'aldolase du muscle de lapin recombinante
à partir de l'étude structurale et cinétique
de certains de ses mutants

Présentée par

Amal Maurady

Membres du jury :

Professeur Gertraud Burger, président- rapporteur

Professeur Jurgen Sygusch, directeur de recherche

Professeur Guy Boileau, membre du jury

Dr Casimir Blonski, examinateur externe

SOMMAIRE

La détermination des structures tertiaires des protéines par rayons X a pour but de nous apporter des connaissances détaillées sur leur repliement et de comprendre la relation entre leur structure et leur fonction. Nous allons montrer par la présente étude comment la cristallographie jumelée à la mutagenèse dirigée peut être utilisée dans la détermination et la compréhension du mécanisme enzymatique de l'aldolase du muscle de lapin.

Les différentes mutations générées visent des acides aminés qui sont, dans la plupart des cas, situés dans le site actif et qui sont impliqués dans la catalyse enzymatique. Certains mutants de l'aldolase du muscle sont analysés par des méthodes cristallographiques, cinétiques, enzymatiques et d'échanges isotopiques. L'enzymologie nous a permis de déterminer les paramètres cinétiques de ces mutants, afin d'établir leur rôle dans la réaction enzymatique. L'étude structurale permet d'avoir une vision directe des types d'interactions au sein d'une enzyme. L'interprétation des données structurales associée aux données cinétiques permet d'analyser avec pertinence la fonction des résidus impliqués dans le mécanisme catalytique de l'aldolase du muscle de lapin. Dans le but de connaître l'implication de certains résidus dans le mécanisme catalytique, nous nous sommes focalisés sur l'étude structurale de plusieurs mutants. Les principaux intérêts de ce travail consistent à connaître si la perte d'activité est directement liée à la mutation ou à un changement global de la structure engendrée par celle-ci, à déterminer la structure mutante formant un complexe avec le substrat ou le produit de la réaction catalytique ainsi qu'à connaître le lien entre l'affinité pour le substrat et un acide aminé bien spécifique. La réponse à toutes ces questions nous a amenés à la résolution des structures cristallographiques de certains mutants. La cristallographie qui donne une vision directe des interactions entre les acides aminés est un puissant outil qui nous renseigne sur la nature et le mode d'action des résidus. Les résultats structuraux nous ont permis de tirer plusieurs

conclusions sur la relation structure/fonction de cette enzyme et de déterminer la nature et le rôle des résidus impliqués dans la catalyse, ainsi que ceux impliqués dans sa conformation. Ces méthodes nous ont également permis de proposer un nouveau modèle du mécanisme enzymatique. Nous discuterons aussi des problèmes liés à la cristallisation des protéines et les méthodes récentes appliquées pour les contourner.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	iii
LISTE DES ARTICLES	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xvii
DÉDICACES	xix
REMERCIEMENTS	xx
AVANT-PROPOS	xxi
INTRODUCTION	
1.1 Préambule	1
1.2 Catalyse enzymatique	1
1.2.1 Réaction catalysée par l'aldolase	1
1.2.2 Description du mécanisme catalytique de l'aldolase de classe I	6
1.3. Structures 3D et sites actif	9
1.3.1 Structures 3D	9
1.3.2 Site actif	9
1.3.2.1 Lysines (Lys)	10
1.3.2.2 Acide aspartique (Asp)	10
1.3.2.3 Acide glutamique (Glu)	11
1.3.2.4 Arginine (Arg)	11
1.3.2.5 Partie C-terminale	11
1.4 L'aldolase du muscle : une enzyme stratégique	12
1.4.1 Structure 3D	12
1.4.2 Site actif	13
1.4.3 Interactions du DHAP	17
1.4.4 Partie C-terminale	20
1.4.5 Site de fixation de l'ion sulfate	22
1.5 Certains complexes de l'adolase du muscle de lapin	24
1.6 Projet de recherche doctoral	25
1.6.1 Mutant E187A	28
1.6.2 Mutant E187Q	29
1.6.3 Mutant K229M	29
1.6.4 Mutant K107M	30

1.7 Méthodes expérimentales élaborées	31
1.7.1 Cinétique enzymatique	32
1.7.2 Cinétique d'échange isotopique	32
1.7.2.1 Intermédiaires de la réaction enzymatique avec le DHAP	34
1.7.2.2 Cinétique d'échange isotopique dans D ₂ O	35
1.8 Cristallisation	36
1.9 L'étude structurale par cristallographie aux rayons X	36
1.10 Complexes de l'aldolase avec son substrat et certains inhibiteurs	37
MATERIEL ET METHODES	38
2.1 Purification de l'aldolase du muscle de lapin native et mutante	38
2.1.1. Introduction	38
2.1.2 Expression de l'aldolase	38
2.1.3 Purification de l'aldolase	39
2.1.4 Méthode de dosage des protéines	40
2.1.5 Analyse des protéines en solution	40
2.2 Étude cinétique de l'aldolase du muscle de lapin	40
2.2.1 Dosage de l'activité catalytique	40
2.2.2 Cinétique enzymatique	43
2.3 Cinétiques d'échange isotopique ³ H/ ¹ H de l'aldolase du muscle de lapin	44
2.3.1 Méthodologie	44
2.3.2 Exploitation des résultats de la cinétique d'échange isotopique ³ H/ ¹ H	45
2.3.3 Intermédiaires de la réaction enzymatique	47
2.4. Étude cristallographique de l'aldolase du muscle du lapin native et mutante	48
2.4.1 Cristallisation de l'aldolase du muscle native et mutante	48
2.4.2 Méthode de cristallisation par "Batch"	49
2.4.3 Cristallisation en microgravité	53
2.4.3.1. Principe et technique	53
2.4.3.2. Cristallisation en microgravité à 4°C	54
2.4.3.3. Cristallisation en microgravité à 22°C	54
2.4.4 Manipulation des cristaux	56
2.4.5 Montage des cristaux	57
2.4.6 Nouvelles formes cristallines de l'aldolase	57
2.5 Détermination et affinement des structures tridimensionnelles de certains mutants de l'aldolase	57
2.5.1 Introduction	57
2.5.2 Calcul de la carte de densité électronique	58
2.5.3 Facteur d'agitation thermique	59
2.5.4 Carte d'exclusion "Omit map"	59
2.5.5 Fusionnement des données de diffraction	59
2.5.6 Minimisation de l'énergie par X-PLOR	60

2.5.7 Minimisation par "Corps-Rigide"	60
2.5.8 L'affinement par "recuit simulé"	60
2.6 Méthodologie de la détermination de la structure de l'aldolase du muscle mutante	61
2.6.1 Affinement cristallographique	61
2.6.2 Modélisation des mutants de l'aldolase	61
2.6.3 Molécules d'eau	62
2.6.4 Qualité du modèle cristallographique	62
RESULTATS ET DISCUSSION	63
3.1 L'expression et la purification de l'aldolase du muscle de lapin native et mutante	63
3.2 Étude cinétique de de l'aldolase du muscle de lapin native et mutante	64
3.2.1 Étude cinétique de l'aldolase native	65
3.2.2 Étude cinétique du mutant K229M	66
3.2.3 Étude cinétique du mutant R258M	68
3.2.4 Étude cinétique du mutant E187Q et E187A	69
3.3 Cinétique d'échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$ et $^1\text{H}/^2\text{H}$	77
3.4 Vue global des acides aminés étudiés	90
3.5 Résultats de la cristallogenèse de l'aldolase native et mutante	92
3.5.1 Cristallisation par la méthode "Batch"	92
3.5.2 Cristallisation par diffusion vapeur	94
3.5.3 Cocrystallisation	94
3.6 Cristallisation en microgravité	98
3.6.1 Cristallisation en microgravité à 4°C	98
3.6.2 Cristallisation en microgravité à 22°C	98
3.6.3 Mesure de la mosaïcité	99
3.6.4 Discussion	105
3.7 Structures tridimensionnelles de certains mutants et complexes de l'aldolase du muscle de lapin	106
3.7.1 Données cristallographiques	106
3.7.2 Données structurales	108
3.8 Étude structurale du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin	110
3.8.1 Introduction	110
3.8.2 Résolution et affinement de la structure 3D du mutant E187A	112
3.8.3 Analyse de la structure 3D du mutant E187A	112
3.8.4 Discussion	122
3.8.4.1 Hypothèse de Westheimer	122
3.8.4.2 Molécules d'eau catalytique	124

3.8.4.3 Site de liaison du DHAP	126
3.8.4.4 Partie C-terminale	128
3.8.4.5 Site de liaison de l'ion SO_4^{2-}	128
3.9 Étude Structurale du mutant E187Q de l'aldolase du muscle de lapin	132
3.9.1 Introduction	132
3.9.2 Résolution et affinement de la structure 3D du mutant E187Q	133
3.9.3 Analyse de la structure 3D du mutant E187Q	134
3.9.4 Discussion	144
3.9.4.1 Hypothèse de Westheimer	144
3.9.4.2 État de charge du résidu Glu-187	147
3.9.4.3 Site de liaison du DHAP	150
3.9.4.4 Partie C-terminale	153
3.9.4.5 Molécules d'eau	153
3.10 Étude structurale du mutant K107M de l'aldolase du muscle de lapin	156
3.10.1 Introduction	156
3.10.2 Analyse structurale du mutant K107M	159
3.10.3 Analyse du site actif	159
3.10.4 Partie C-terminale	168
3.10.5 Discussion	169
3.11 Étude structurale du mutant K229M de l'aldolase du muscle de lapin	172
3.11.1 Introduction	172
3.11.2 Analyse structurale du mutant K229M	175
3.11.3 Analyse du site actif	175
3.11.4 Partie C-terminale	180
3.11.5 Discussion	181
3.12 Structures 3D des complexes aldolase-hexitol-1,6-bisphosphate et K229M-hexitol-1,6-bisphosphate	184
3.12.1 Introduction	184
3.12.2 Analyse de la structure 3D	184
CONCLUSION	187
4.1 Lysine 229	189
4.2 Glutamate 187	190
4.3 Lysine 146	191
4.4 Aspartate 33	192
4.5 Serine 271	192
4.6 Résidus hydrophobes	193
4.7 Molécule d'eau catalytique chez le mutant E187A	193
4.8 Absence du DHAP chez les mutants K229M, K107M, E187A et E187Q	193
4.9 Partie C-terminale	194
4.10 Groupement sulfate	195
4.11 Mutations et l'état de charge des acides aminés de l'aldolase	195

4.12 Modèle proposé du mécanisme enzymatique de l'aldolase du muscle	197
4.13 Perspectives	200
REFERENCES	202
ANNEXE	215

LISTE DES ARTICLES

ARTICLE1. Crystal Structures of the E187A and E187Q Mutants of D-Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from Rabbit Muscle

AUTHORS : Maurady A., Sygusch J. and Zdanov A.

JOURNAL : Biochemistry (soumis, janvier 2000)

INTRODUCTION

METHODS

Kinetics

X-ray Crystallography

Modeling the three-dimensional structure

RESULTS

Hypothesis of Westheimer

Catalytic water molecule in the E187A mutant

Negative charge of the Glu-187

C-terminale mobility

DISCUSSION

REFERENCES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La réaction de rétro aldolisation catalysée par l'aldolase	1
Figure 2 : Cycle de la glycolyse (Voet et Voet, 1990)	5
Figure 3 : Les étapes du mécanisme catalytique de l'aldolase de classe I	8
Figure 4 : Représentation en ruban de la structure tridimensionnelle du monomère de l'aldolase de muscle de lapin recombinante en forme de '(α/β)baril', le facteur d'agitation thermique B des résidus varie de 3 à 50 Å ² (du rouge au bleu) (Blom et Sygusch., 1997)	14
Figure 5 : Résidus du site actif (Lys-229, Lys-146, Lys-107, Glu-187, Asp-33, Arg-148, Leu-270, Ser-300 et Ser-271) de l'aldolase du muscle de lapin (Blom et Sygusch., 1997)	15
Figure 6 : Interactions entre le DHAP et les résidus du site actif de l'aldolase du muscle de lapin dans le site A et B (haut) de la sous-unité 1 et C (bas) de la sous-unité 2	16
Figure 7 : États intermédiaires du DHAP (D) et du substrat FBP (F) catalysés par l'aldolase de classe I (E)	18
Figure 8 : Faces (re) et (si) du carbonyle du DHAP	19
Figure 9 : Les différentes conformations adoptées par la partie C-terminale dans la sous-unité 1, 2, 3 et 4 chez l'aldolase du muscle de lapin	21
Figure 10 : Site de liaison de l'ion sulfate chez l'aldolase du muscle de lapin dans le site 1 (haut) et le site 2 (bas) (Blom et Sygusch., 1997)	23
Figure 11 : Le substrat FBP et les inhibiteurs utilisés dans la formation des complexes de l'aldolase du muscle de lapin	24
Figure 12 : La réaction d'échange isotopique du ³ H/ ¹ H en position pro-S du DTAP catalysée par l'aldolase du muscle de lapin (E) dans l'eau	35
Figure 13 : Dosage enzymatique couplé de l'aldolase de classe I	41
Figure 14 : Diagramme de solubilité indiquant les étapes de la cristallisation par la méthode "Batch"	51
Figure 15 : Les étapes de cristallisation par "Batch" de l'aldolase du muscle de lapin native et de certains de ses mutants	52

Figure 16 : Technique de cristallisation en microgravité avec le dispositif "DMDA"	55
Figure 17 : Procédure d'extraction des macles des cristaux d'aldolase du muscle de lapin	56
Figure 18 : Gel SDS-PAGE de certains mutants E187Q, E187A et K229M de l'aldolase du muscle de lapin lors des quatre étapes de purification (Lyse, DEAE, CM et Gel filtration)	63
Figure 19 : Courbe d'élution de l'aldolase mutante par gel filtration (Superdex)	62
Figure 20 : Profils de pH de l'aldolase du muscle de lapin native	71
Figure 21 : Profils de pH du mutant E187Q de l'aldolase du muscle de lapin	72
Figure 22 : Profils de pH du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin	73
Figure 23 : Profils de pH du mutant E187D de l'aldolase du muscle de lapin	74
Figure 24 : Formation du méthylglyoxal et de l'orthophosphate à partir du DHAP	83
Figure 25 : Variation de la quantité T_2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP	87
Figure 26 : Variation de la quantité T_2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants K107M et S271A de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP	88
Figure 27 : Variation de la quantité T_2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants K146A et K146M de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP	89
Figure 28 : Variation de la quantité T_2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants E187A et E187Q de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP	90
Figure 29 : Variation de la quantité T_2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants D33N et D33S de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP	84
Figure 30 : Cristaux des mutants de l'aldolase native et mutante (K229M, K107M, K146M, D33N, E187Q, E187A, S271A) obtenus par la méthode "Batch" dans le sulfate d'ammonium à 22°C (gauche). Forme finale du cristal après enlèvement des macles, dimension (0.7 x 0.5 x 0.2 mm)(droite)	93

- Figure 31 : Patron de diffraction des cristaux de l'aldolase de muscle de lapin native de dimension (0.7 x 0.6 x 0.3 mm) obtenus en microgravité dans du PEG8K à 4°C et diffractant à 2.7 Å de résolution 101
- Figure 32 : Patron de diffraction des cristaux de l'aldolase de muscle de lapin native de dimension (0.9 x 0.65 x 0.3 mm) obtenus en microgravité dans du PEG20K à 4°C et diffractant à basse de résolution 102
- Figure 33 : La comparaison du profil correspondant à la mosaïcité des cristaux terrestres et ceux de l'espace pour une même réflexion 103
- Figure 34 : Diagramme de Ramachandran du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin 117
- Figure 35 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_α de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et du mutant E187A 119
- Figure 36 : Superposition des résidus du site actif des sous-unités 1 et 2 du mutant E187A et de ceux de l'aldolase du muscle de lapin (bleu) 120
- Figure 37 : Superposition des résidus du site actif des sous-unités 3 et 4 du mutant E187A et de ceux de l'aldolase du muscle de lapin (bleu) 121
- Figure 38 : Densité électronique correspondant à la molécule d'eau (1377) dans la cavité créé par la mutation du Glu-187 en alanine dans la sous-unité 1 du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin 125
- Figure 39 : Les différentes conformations adoptées par les résidus du mutant E187A et ceux qui interagissent avec l'ion sulfate dans son site 1 chez l'aldolase du muscle de lapin (bleu) 130
- Figure 40 : Les différentes conformations adoptées par les résidus du mutant E187A et ceux qui interagissent avec l'ion sulfate dans son site 2 chez l'aldolase du muscle de lapin (bleu) 131
- Figure 41 : Diagramme de Ramachandran du mutant E187Q de l'aldolase du muscle de lapin 136
- Figure 42 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_α de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et du mutant E187Q 142

- Figure 43 : Superposition des résidus du site actif des sous-unités 1 (haut) et 2 (bas) du mutant E187Q et de l'aldolase du muscle de lapin (bleu) 143
- Figure 44 : Superposition des résidus du site actif des sous-unités 3 (haut) et 4 (bas) du mutant E187Q et de ceux de l'aldolase du muscle de lapin (bleu) 145
- Figure 45 : Superposition du site actif de l'aldolase native (bleu) et du mutant E187Q montrant le rapprochement du Glu-189 du résidu muté Gln-187 chez E187Q 149
- Figure 46 : Profils de pH du mutant K107M de l'aldolase du muscle de lapin 158
- Figure 47 : Diagramme de Ramachandran du mutant K107M de l'aldolase du muscle de lapin 161
- Figure 48 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_{α} de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et du mutant K107M 162
- Figure 49 : Représentation en stéréo de la superposition du site actif de la sous-unité 1 du mutant K107M de celui de l'aldolase du muscle de lapin (bleu) 165
- Figure 50 : Densité électronique correspondant à la Met-107 du site actif dirigée vers le résidu hydrophobe le plus proche (Phe-79) de la sous-unité 1 du mutant K107M de l'aldolase du muscle de lapin 166
- Figure 51 : Nombre de molécules d'eau interagissant avec les trois lysines (Lys-229, Lys-1446, Lys-107) du site actif des quatre sous-unités des mutants K229M, E187Q, K107M, E187Q et de l'aldolase native 171
- Figure 52 : Diagramme de Ramachandran du mutant K229M de l'aldolase du muscle de lapin 173
- Figure 53 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_{α} de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et du mutant K229M 174
- Figure 54 : Densité électronique correspondant à la Met-229 à proximité des résidus hydrophobes proches voisins (Leu-270, Ile-185, Ile-77) dans la sous-unité 1 du mutant K229M de l'aldolase du muscle de lapin 179
- Figure 55 : Mécanisme enzymatique proposé dans le cas de l'aldolase de classe I 199

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Liste des inhibiteurs utilisés dans l'étude structurale des complexes de l'aldolase du muscle de lapin	25
Tableau II : La liste des mutants de l'aldolase du muscle de lapin étudiés	30
Tableau III: Activité spécifique de l'aldolase du muscle native et mutante à pH 7	68
Tableau IV : Données cinétiques du mutant R258M en fonction du pH	69
Tableau V: Données cinétiques du mutant E187Q en fonction du pH	70
Tableau VI : Paramètres cinétiques de l'aldolase native et des mutants du résidu Glu-187 à pH 7	75
Tableau VII : Vitesses des échanges isotopiques $^3\text{H}/^1\text{H}$ et $^1\text{H}/^2\text{H}$ en position C_3 du DHAP catalysé par l'aldolase native et ses mutants	78
Tableau VIII: Vitesse d'échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$ corrigée en fonction de la quantité de base de Schiff formée lors de la réaction	85
Tableau IX : Variation de la résolution en fonction du tampon	96
Tableau X: Caractérisation des cristaux obtenus par les nouvelles conditions de cristallisation	96
Tableau XI : Résultats de cristallisation des complexes de l'aldolase native et mutante	97
Tableau XII : Conditions de cristallisation de l'aldolase native en microgravité en présence du PEG20K à 4°C	100
Tableau XIII : Conditions de cristallisation de l'aldolase native en microgravité en présence du PEG8K à 4°C	100
Tableau XIV : Condition de cristallisation de la forme III de l'aldolase à 22°C en microgravité	104
Tableau XV : Pouvoir de diffraction des cristaux de l'espace et terrestres	104
Tableau XVI : Résultats de diffraction des cristaux des mutants de l'aldolase du muscle	107
Tableau XVII : Données cristallographiques et de l'affinement du mutant E187A	118

Tableau XVIII : Interactions entre les acides aminés du site actif du mutant E187A de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses	123
Tableau XIX : Les résidus dont le changement conformationnel chez le mutant E187A déstabilise le site A, B ou C du DHAP par encombrement stérique (#) ou par perte d'une liaison hydrogène (*)	127
Tableau XX : Les interactions entre les résidus et les oxyanions O ₁ , O ₃ et O ₄ ainsi que le groupement hydroxyle de l'ion sulfate dans ces deux sites de fixation chez l'aldolase native	129
Tableau XXI : Données cristallographiques de l'affinement du mutant E187Q	135
Tableau XXII : : Interactions entre les acides aminés du site actif du mutant E187Q de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses	141
Tableau XXIII : Les distances entre les résidus 187 et 189 dans les deux structures, native et mutante, E187Q	148
Tableau XXIV : Distances du groupement e-ammonium de la chaîne latérale de l'Arg-303 et de l'Arg-42 dans les 4 sous-unités du tetramère du mutant E187Q et de l'aldolase native (WT)	152
Tableau XXV : Les résidus dont le changement de conformation chez le mutant E187Q déstabilise le site A, B ou C du DHAP DHAP par encombrement stérique (#) ou par perte d'une liaison hydrogène (*)	155
Tableau XXVI : Données cristallographiques et de l'affinement du mutant K107M	160
Tableau XXVII : Interactions entre les acides aminés du site actif du mutant K107M de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses	164
Tableau XXVIII : Données cristallographiques et de l'affinement du mutant K229M	173
Tableau XXIV : Interactions entre les acides aminés du site actif du mutant K229M de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses	177

Tableau XXVV : Données cristallographiques et de l'affinement des complexes
Aldolase-hexitol-1,6-bisphosphate et K229M-hexitol-1,6-bisphosphate

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

As	activité spécifique
Arg	arginine
Asp	aspartate
BSA	albumine du sérum bovin
CM	carboxy-terminal
Cys	cystéine
DEAE	diéthyl amino éthyle
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DTT	DL-dithiotreitol
3D	tridimensionnelle
E	enzyme
E. coli	Escherichia coli
F1P	fructose-1 phosphate
FDP	fructose-1,6-diphosphate
FPLC	“ Fast Protein Liquid Chromatography ”
GAP	glyceraldéhyde-3 phosphate
Gln	glutamine
Glu	glutamate
Ile	isoleucine
ke	constante d'efficacité catalytique
k	constante de vitesse
k_{cat}	constante catalytique
K_m	constante de Michaelis
Leu	leucine
Lys	lysine
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
PEG	polyéthylène glycol
Phe	Phénylalanine

DEDICACES

A ma famille

REMERCIEMENTS

D'abord mes vifs remerciements à mon directeur de recherche, le professeur Jurgen Sygusch.

Je tiens à adresser mes remerciements aux personnes avec qui j'ai travaillé au laboratoire en particulier au Dr. Nick Blom ainsi qu'à Steve, Anne, Danielle, Christine, et Julie.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai collaboré au laboratoire LCMB à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Je remercie tout particulièrement tous mes amis qui m'ont soutenu moralement et aidé en particulier Hafsa, Mohammed, Marie et Virginie.

Je remercie infiniment M^{me} Solange Amar pour son aide très précieuse dont je me souviendrais.

AVANT-PROPOS

La cristallographie aux rayons X représente un outil de base dans la détermination des structures des macromolécules biologiques. L'analyse des structures tridimensionnelles jumelée à d'autres études de génie génétique et d'enzymologie nous permettent d'acquérir une meilleure compréhension de la relation structure-fonction des enzymes ainsi que de comprendre leur mécanisme catalytique. Nous avons donc ici utilisé ces différentes méthodes en parallèle. Elles ont permis d'obtenir des informations complémentaires sur le mécanisme catalytique de l'enzyme ciblée.

INTRODUCTION

1.1 Préambule

La cristallographie, étude de la structure des molécules par diffraction aux rayons X, est un outil de recherche qui nous permet de réunir toutes les informations clés sur la structure des macro et micro molécules. Pour les protéines, cette technique est utilisée pour une meilleure compréhension de leur mécanisme catalytique à partir de la détermination de leur structure et de leur fonction. La connaissance du mode de fixation des ligands chez les enzymes émane des données structurales qui, jumelées avec d'autres données biochimiques (enzymologie, génie génétique), permettent de comprendre et d'expliquer la fonction catalytique de certaines protéines. Dans le cas de l'aldolase du muscle de lapin, ces techniques seront consacrées à l'étude du mécanisme enzymatique.

1.2 Catalyse enzymatique

1.2.1 Réaction catalysée par l'aldolase

L'enzyme glycolytique Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (EC 4. 1. 2. 13) catalyse le clivage réversible du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) en D-glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP) (Figure 1). Elle intervient à la 4^e étape du cycle de la glycolyse qui transforme le glucose en pyruvate en produisant de l'énergie sous forme de deux molécules d'ATP (Figure 2).

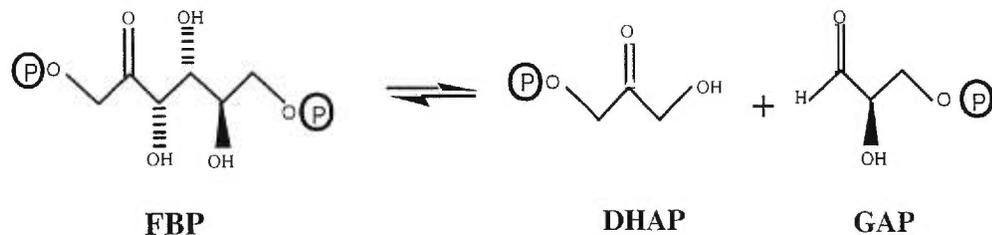


Figure 1 : La réaction de rétroaldolisation catalysée par l'aldolase

On distingue deux classes d'aldolases qui diffèrent par leurs propriétés biochimiques et structurales. La classe I et II sont relativement bien connues (Thomson et al., 1998) et elles sont exprimées chez les eucaryotes et les procaryotes. La répartition des aldolases de classe I et II dans divers organismes est citée ci-dessous : (Thomson et al., 1998, Gross et al., 1999, Moorhead et al., 1990, Pelzer-Reith et al., 1993 et Lebherz et al., 1984).

Archaébactéries :

Classe I : *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium R-113*, *Halobacterium vallismortis*, *Halobacterium CH-1*.

Classe II : *Halobacterium halobium*, *Halobacterium mediterranei*, *Halobacterium volcanii*.

Eubactéries :

Classe I : *Mycobacterium smegmatis*, certains *Staphylococci*, certains *Peptococci*.

Classe II : Cyanobactéries, *Staphylococcus caseolyticus*, certains *Peptococci*, *Rhodopseudomonas spheroides*.

Classe I et II : Certains *Staphylococci*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*.

Eucaryotes :

Classe I : Metazoaires (humain, rat, lapin, *Drosophila*), Viridiaeplantae (*Spinacia oleracea*, *Zea mais*, carottes, *Orryza sativa*), Protistes (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium bergeri*).

Classe II : Champignons.

Classe I et II : Protistes (algues vertes : *Euglena gracilis*, *Chlamydomonas mundana*, certains *Chlorella*), algues rouges (certains membres du genre *Chondrus*) et algues brunes (certains *Ochromonas*).

Sur la base des similitudes de la séquence primaire, des propriétés catalytiques et des similitudes structurales les aldolases de ces différents organismes ont été classifiées dans la classe I ou II. Ces aldolases peuvent également avoir des propriétés différentes de celles de ces deux classes. Ceci rend leur classification difficile. Les aldolases de classe I exprimées chez les plantes et certaines algues peuvent avoir des caractéristiques semblables à celles des différentes isoenzymes (A, B et C) de cette classe et principalement vis-à-vis de la spécificité par rapport aux substrats F1P et FBP et de l'inhibition par l'AMP et l'ATP. Ce qui ne permet pas leur classification dans ces trois catégories. L'aldolase de maïs quant à elle a été étudiée par mutagenèse dirigée et a révélé l'implication de la partie C-terminale et principalement la Tyr-363 dans son activité catalytique (Berthiaume et al., 1991).

Les séquences primaires des aldolases de classe I et II ont de faibles similitudes variant de 17 à 20 %. La phylogénie, les différences dans la localisation et la nature des résidus du site actif appuient la théorie de l'évolution indépendante de ces deux classes (Marsch et al., 1992).

Ces deux classes I et II catalysent la même réaction enzymatique, mais selon deux mécanismes différents. La classe I se caractérise par la formation d'un intermédiaire base de Schiff avec son substrat, tandis que la classe II ne forme pas d'intermédiaire covalent avec le substrat et utilise un cofacteur, ion métallique lors de la réaction enzymatique. L'EDTA engendre une inactivation totale des aldolases de classe II (Rutter, 1964). Les sites actifs de ces deux classes sont différents. Celui de la classe I contient trois lysines dont l'une forme la base de Schiff avec le substrat. Celui de la classe II possède trois histidines et un glutamate qui stabilisent le cofacteur métallique.

Chez la classe I, exprimée chez les mammifères, on distingue trois isoenzymes soit A, localisées dans le muscle et la majorité des tissus, B dans le foie et les reins et C dans le cerveau (Horecker et al., 1972). Les isoenzymes de l'aldolase de classe I (A, B et C) ont un poids moléculaire d'environ 160 kD. Si le mécanisme

réactionnel de ces trois isoenzymes est identique, cependant la vitesse de formation des intermédiaires réactionnels est différente. En effet, l'étape catalytique la plus lente chez les isoenzymes B, correspond à la protonation du carbanion, alors que chez les isoenzymes A c'est la libération du DHAP qui s'effectue avec la vitesse la plus lente comparée aux autres étapes du mécanisme catalytique (Rose et al., 1987). Ces étapes sont décrites dans la figure 3.

Ces isoenzymes possèdent, en plus du fructose-1,6-bisphosphate (FBP), le fructose-1-phosphate (F1P) comme substrat. Chacune de ces isoenzymes se distingue par des propriétés catalytiques légèrement différentes selon leur origine (muscle, foie ou cerveau). Elles diffèrent dans leur spécificité par rapport à ces deux substrats, le F1P et le FBP. En effet, le rapport d'activité spécifique FBP / F1P varie aux alentours de 50 chez l'aldolase de type A, de 1 chez celle de type B et de 12 chez celle de type C (Penhoet et al., 1969).

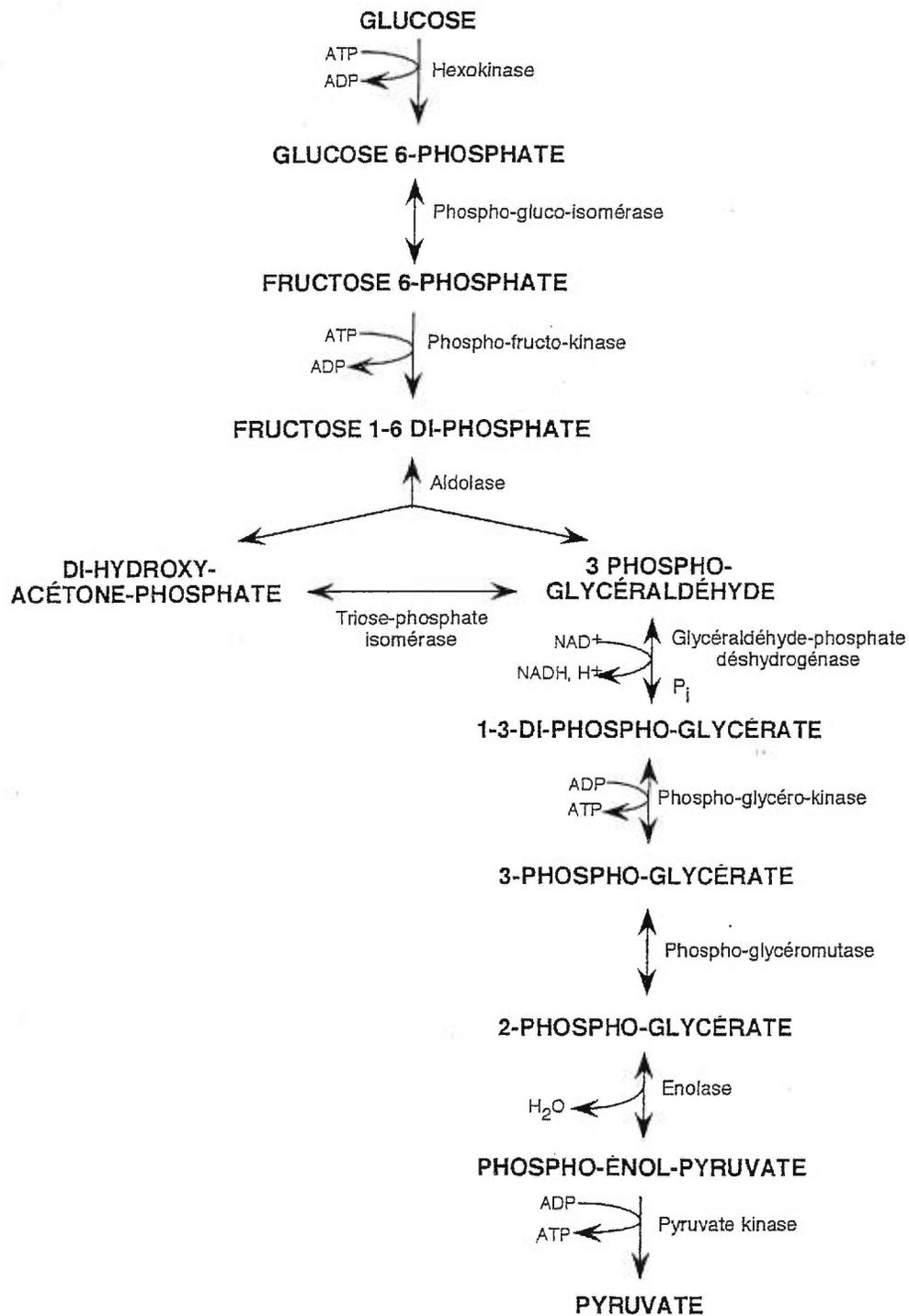


Figure 2 : Cycle de la glycolyse (Voet et Voet, 1990).

1.2.2 Description du mécanisme catalytique de l'aldolase de classe I

Les études précédentes ont déterminé que le mécanisme enzymatique de l'aldolase de classe I, en terme d'intermédiaire réactionnel, se déroule en 7 étapes essentielles (Figure 3). Le FBP existe essentiellement sous les formes furanose et pyranose en solution, mais seule la forme ouverte (cétone) minoritaire se lie à l'aldolase (Midelfort et al., 1976) .

- L'attaque nucléophile de la Lys-229 sur le carbone C₂ du substrat FBP ;
- Formation de la carbinolamine ;
- Formation de la base de Schiff (ion immonium) à partir de la déshydratation de la carbinolamine;
- La charge positive au niveau de l'azote du FBP sous forme de base de Schiff crée un "puits" d'électron qui fragilise la liaison C₃-C₄ du substrat et entraîne le clivage de celle-ci après abstraction du proton de l'oxygène du carbone C₄. A partir de cette étape catalysée par un résidu du site actif non encore identifié, il en résulte la formation d'un intermédiaire énamine (carbanion) et du GAP qui est libéré par l'enzyme ;
- Protonation du carbone C₃ de l'énamine qui conduit à une nouvelle base de Schiff (DHAP base de Schiff) ;
 - Hydrolyse de cette base de Schiff qui conduit à la formation du DHAP sous forme de carbinolamine ;
 - Libération du DHAP.

La réaction inverse qui synthétise le FBP à partir du DHAP et du GAP fait appel aux mêmes intermédiaires soit la carbinolamine, l'énamine et l'immonium. L'identification des intermédiaires de la réaction enzymatique a été réalisée grâce à des techniques diverses. La spectroscopie UV a permis de mettre en évidence l'intermédiaire énamine suggéré être responsable de l'absorbance du complexe de l'aldolase avec le DHAP à 240 nm (Mehler et al., 1963). Les réactions d'oxydation par l'hexacyanoferrate (III) ont permis de mesurer le taux de carbanion formé lors de la réaction enzymatique de

l'aldolase sur son substrat (Healy et al., 1972). Le nombre des états intermédiaires différent selon qu'on utilise le FBP ou le DHAP comme substrat. En effet, la production de l'intermédiaire carbanion du substrat FBP, nécessite la formation du FBP sous forme la base de Schiff, l'abstraction de l'hydrogène de l'hydroxyle du carbone C₄ et le clivage de la liaison C₃-C₄. Tandis que la formation du carbanion à partir du DHAP, dépend seulement de la formation du DHAP sous forme de base de Schiff et de l'abstraction de l'hydrogène pro-S du carbone C₃. D'autres expériences dont celles des échanges isotopiques ont mis en évidence l'existence de l'intermédiaire énamine (Rose et Rieder ., 1976). La réduction par le borohydrure de sodium a permis l'identification de l'intermédiaire immonium (Horecker et al., 1972). La quantité de ces intermédiaires covalents marqués au ³²P a été déterminée par précipitation acide (Rose et Warms., 1985).

Si le mécanisme de l'aldolase est bien connu au niveau des intermédiaires réactionnels, il l'est beaucoup moins au niveau des résidus impliqués dans la catalyse. En effet même si l'aldolase est étudiée depuis plus d'une quarantaine d'années, il est difficile d'établir le rôle des différents résidus du site actif dans la catalyse. Le nombre important des résidus du site actif (Lys-229, Lys-107, Lys-147, Asp-33, Glu-187, Glu-189, Arg-148, Ser-300, Ser-271) et la possibilité d'avoir différents rôles dans le mécanisme est la principale raison de ce problème. Le seul résidu dont le rôle est défini est la Lys-229 (Grazi et al., 1962). La détermination du rôle des autres résidus de site actif et la nature de leur implication dans les différentes étapes de la catalyse va permettre la compréhension et l'établissement d'un mécanisme catalytique plus détaillé de l'aldolase.

1.3 Structures 3D et site actif

1.3.1 Structures 3D

La structure tridimensionnelle des aldolase de classe I déterminée à ce jour, par diffraction aux rayons X, est celle du muscle humain (Gamblin et al., 1990), de la *Drosophila melanogaster* (Hester et al., 1991), du *Plasmodium falciparum* (Kim et al., 1998) et celle du muscle de lapin (Sygusch et al., 1987 ; Blom & Sygusch, 1997). L'architecture moléculaire de l'aldolase de classe I correspond au motif en forme de tonneau (α/β)₈. Ce motif structural se retrouve chez plusieurs enzymes dont la triose phosphate isomérase (Faber et Petsko., 1990). En général, pour ce genre de structure, le site actif est situé à l'extérieur du tonneau (α/β)₈, sauf pour l'aldolase pour laquelle le site actif est situé au centre du tonneau et accessible pour le substrat *via* la partie C-terminale (Figure 4).

1.3.2 Site actif

La conservation de la séquence des isoenzymes de l'aldolase au cours de l'évolution (évolution des espèces à travers le temps), amène l'hypothèse que les résidus conservés entre les aldolases d'une même classe pourraient jouer un rôle dans le mécanisme catalytique (Tolan et al., 1987, Kukita et al., 1988). Or, ces résidus ne sont pas tous dans le site actif, mais sont situés loin de celui-ci. De ce fait, la résolution des structures 3D de certaines isoenzymes a permis de mettre en évidence l'identité des résidus du site actif.

En effet, les acides aminés conservés dans la séquence des aldolases de classe I, au niveau du site actif, sont : Asp-33, Ile-77, Lys-107, Phe-144, Lys-146, Arg-148, Ile-185, Glu-187, Glu-189, Lys-229, Leu-270, Ser-300. L'aldolase possède, à proximité de son site actif deux sites de liaison du groupement phosphate correspondant respectivement aux phosphates P₁ et P₆ du substrat FBP. La constante de dissociation de ces groupements est de 1.1 mM pour le P₁ et de 28 mM pour le P₆ (Ginsburg et Mehler,

1966). La structure tridimensionnelle de l'aldolase du muscle de lapin a permis de mettre en évidence les résidus du site actif de connaître la position des cystéines 72 et 338 pour lesquelles le rôle catalytique antérieurement attribué par Lai en 1974, ne peut être réel à cause de leur position éloignée par rapport au site actif (Sygusch et al., 1987).

Les études citées dans la littérature proposent pour certains résidus du site actif (Lys-229, Lys-107, Asp-33, Lys-146, Arg-148) et pour la partie C-terminale, un ou plusieurs rôles dans le mécanisme enzymatique qui sont énumérés ci-dessous.

1.3.2.1 Lysines (Lys)

Trois lysines du site actif sont impliquées dans l'activité de l'aldolase. La Lys-229 forme la base de Schiff avec le carbone C₂ du substrat FBP. L'isolation et le séquençage du peptide contenant la base de Schiff réduite a permis de mettre en évidence l'identité de ce résidu (Lai et al., 1974). La Lys-229 est le seul résidu du site actif dont on connaît le rôle, sans aucune ambiguïté.

La Lys-146 semble intervenir dans plusieurs étapes de la réaction catalytique. Cette lysine serait responsable de la stabilisation des intermédiaires réactionnels (Gupta et al., 1993). Elle a été suggérée pour participer à la liaison du phosphate P₁ du FBP (Hartman et al., 1976). La Lys-146 est impliquée dans la fixation du DHAP dans le site actif (Blom et Sygusch., 1997). La Lys-107 a été proposée de jouer un rôle dans la fixation du groupement phosphate P₆ du FBP (Anai et al., 1973 et Palczewski et al., 1985).

1.3.2.2 Acide aspartique (Asp)

L'Asp-33, situé proche de la Lys-146, a été étudié par des expériences de mutagenèse dirigée (Morris et Tolan., 1993). La caractérisation cinétique des mutants D33N et D33S n'a pas permis l'identification d'un rôle précis de l'Asp-33 dans le mécanisme catalytique de l'aldolase du muscle de lapin. Ces études ont avancé l'idée que l'Asp-33 serait probablement impliquée dans l'augmentation du pK_a du résidu basique

responsable de l'abstraction du proton de l'hydroxyle du carbone C₄ du FBP. Cependant, le rôle de l'Asp-33 peut se limiter à la stabilisation de la conformation du DHAP ou du FBP au niveau de l'intermédiaire immonium.

1.3.2.3 Acide glutamique (Glu)

Grâce à sa position dans le site actif entre la Lys-229 et la Lys-146, le résidu Glu-187 serait idéal pour participer à plusieurs étapes de la catalyse, dont la déshydratation de la carbinolamine, l'abstraction de l'hydrogène de l'hydroxyle du carbone C₄ ou la protonation de l'énamine. Le Glu-187 peut être également responsable de la capture de l'hydrogène de la Lys-229 pour lui permettre l'attaque nucléophile sur le carbonyle du substrat FBP ou DHAP.

1.3.2.4 Arginine (Arg)

L'inactivation de l'aldolase par des composés α -dicarbonylés spécifiques des résidus arginines a mis en évidence l'implication d'un tel résidu dans l'activité enzymatique de l'aldolase (Yankeelov et al, 1968). Cette arginine est probablement l'Arg-148 qui, en raison de sa position dans le site actif proche de la Lys-146, est prédisposée à la fixation du groupement phosphate DHAP (Lobb et al., 1976).

1.3.2.5 Partie C-terminale

La partie C-terminale, formée par les résidus 344 à 363, possède une faible homologie dans cette famille d'aldolases de classe I et se trouve impliquée dans la spécificité de liaison par rapport au substrat FBP (Rose et al., 1965). Elle possède des conformations différentes dans les structures de classe I déterminées, dont certaines, ont une interaction avec le site actif. Cette partie impliquant principalement la Tyr-363 dans l'activité catalytique a été démontrée par des expériences de mutagenèse dirigée (Berthiaume et al., 1991). En plus de l'implication de la partie C-terminale de l'aldolase de classe I dans son activité catalytique, il a été démontré par l'étude cinétique des aldolases chimères

entre celle du muscle et de foie de lapin avec celle de maïs, que les résidus 346 à 349 stabilisent la liaison du groupement phosphate du carbone 6 du FBP et que les résidus 357 à 362 optimisent les interactions entre la partie C-terminale et le site actif (Berthiaume et al., 1993).

Chez l'aldolase de *Drosophila melanogaster* (Hester et al., 1991), la partie C-terminale est proche du site actif. Par contre, chez l'aldolase de muscle humain ou de lapin, elle interagit avec le tétramère voisin. Elle possède la capacité d'incorporer un groupement phosphate par liaison covalente avec l'His-361 et la Tyr-361 respectivement chez les isoenzymes B et A (Sygusch et al., 1987).

L'aldolase du muscle de lapin a été ciblée pour l'étude du mécanisme catalytique des aldolases de classe I pour apporter des informations supplémentaires qui nous permettrons de savoir comment ces résidus participent à la formation des intermédiaires réactionnels (carbinolamine, immonium, énamine) lors de la réaction de rétroaldolisation du substrat FBP par cette enzyme.

1.4 L'aldolase du muscle de lapin : une enzyme stratégique

L'aldolase du muscle de lapin a un poids moléculaire de 160 kD, un point isoélectrique de 8.5 et elle conserve une activité enzymatique stable entre le pH 6 et 9. La vitesse maximale V_{\max} de sa réaction catalytique est de 16 U/mg pour une enzyme fraîchement purifiée et son affinité (K_m) pour les substrats F1P, le FBP et le DHAP est de 60 μM , 2 μM et 58 μM (Rutter et al., 1964). L'aldolase du muscle de lapin a un site actif conservé dans toutes les isoenzymes A, B et C ; par contre, la partie C-terminale formée par les résidus 344 à 363 est différente.

1.4.1 Structure 3D

La première structure tridimensionnelle de l'aldolase du muscle, résolue à 2.7 Å sous forme d'un tétramère, nous donne une vision directe de toute la structure et principalement du site actif (Sygusch et al., 1987). Cette structure a démontré que deux

cystéines 72 et 338 qu'on croyait être impliquées dans le transfert de protons entre le carbone C₄ du FBP et le groupement ε-ammonium d'une lysine du site actif sont, en fait, positionnées loin de la cavité du site actif et ne peuvent, par conséquent, avoir un rôle catalytique (Takahashi et al., 1989, Horecker et al., 1972). Les changements structuraux engendrés à la suite des modifications chimiques des cystéines se sont avérées responsables de l'inactivation de l'aldolase (Heyduk et al., 1986). Par contre, le rôle de la partie C-terminale de l'aldolase du muscle n'a pu être mise en évidence.

La structure de l'aldolase du muscle de lapin a donc été déterminée à plus haute résolution, 1.9 Å (Blom et al., 1997). Celle-ci a permis d'identifier, en plus des résidus du site actif (Lys-229, Lys-146, Asp-33, Glu-187, Arg-148, Ser-271, Ser-300), ceux de la partie C-terminale qui ont été déterminés grâce à l'effet du solvant sur l'amélioration de la qualité de la structure tridimensionnelle (Blom et Sygusch., 1997).

1.4.2 Site actif

Le site actif de l'aldolase du muscle situé à l'intérieur du tonneau α/β , est accessible via la partie C-terminale formée par les résidus 344 à 363 et les deux hélices formées par les résidus 34 à 43 et 340 à 346 (Figure 4). Le site actif est formé par des résidus cationiques (Lys-229, Lys-146, Lys-107, Arg-148 et Arg-303), anioniques (Glu-187, Asp-33) et polaires (Ser-271 et Ser-300) (Figure 5). Ces résidus sont positionnés de la manière suivante : Lys-229, Lys-146 et Lys-107, dont les chaînes latérales sont parallèles entre elles, interagissent simultanément avec deux résidus anioniques, à savoir le Glu-187 et l'Asp-33.

Cette structure montre la présence du DHAP dans les deux premières sous-unités du tétramère et révèle la nature des interactions qui peuvent être des liaisons électrostatiques ou hydrogènes ou, tout simplement, des contacts de Van Der Waals qui sont établis avec les résidus du site actif (Figure 6). Ces interactions vont être traitées en détail dans le paragraphe qui suit.

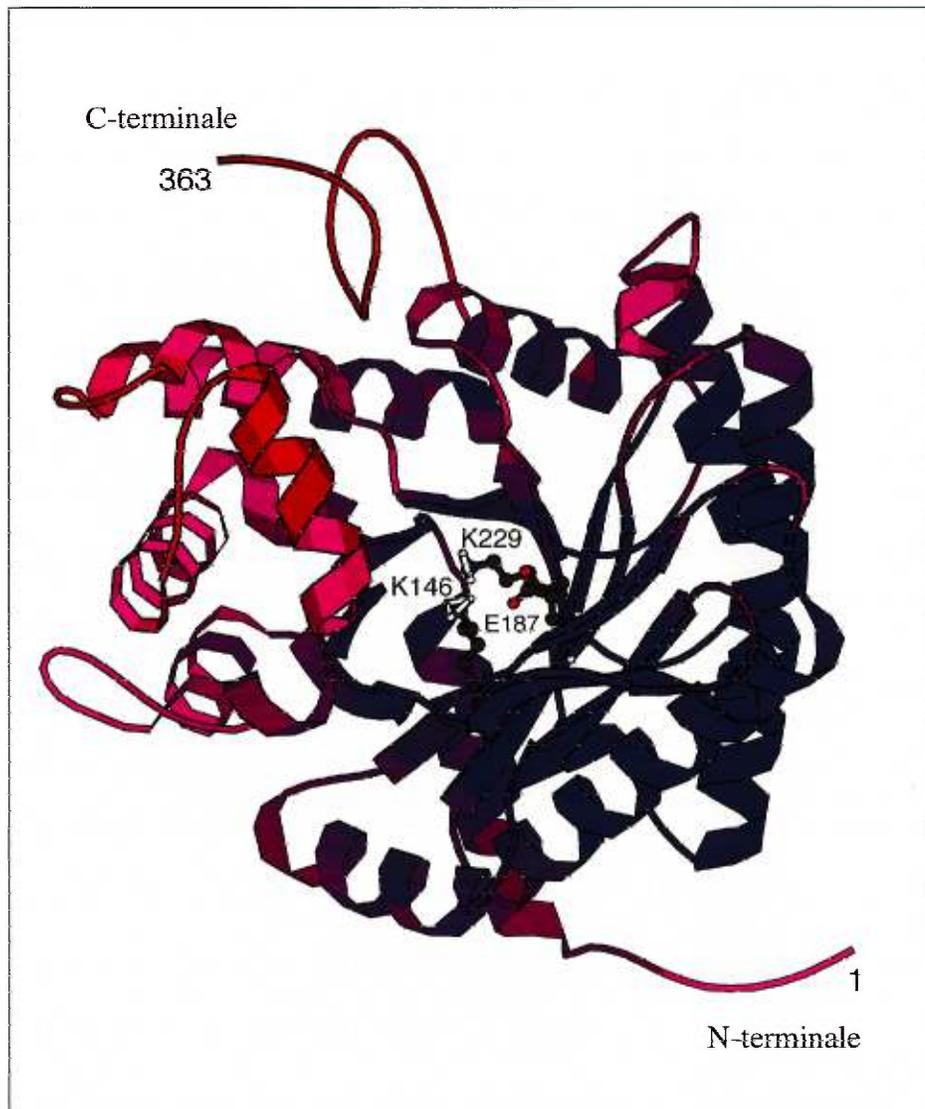


Figure 4 : Représentation en ruban de la structure tridimensionnelle d'un monomère de l'aldolase du muscle de lapin recombinante en forme de ' (α/β) baril', le facteur d'agitation thermique des résidus varie de 3 à 50 (bleu au rouge) (Blom et Sygusch., 1997)

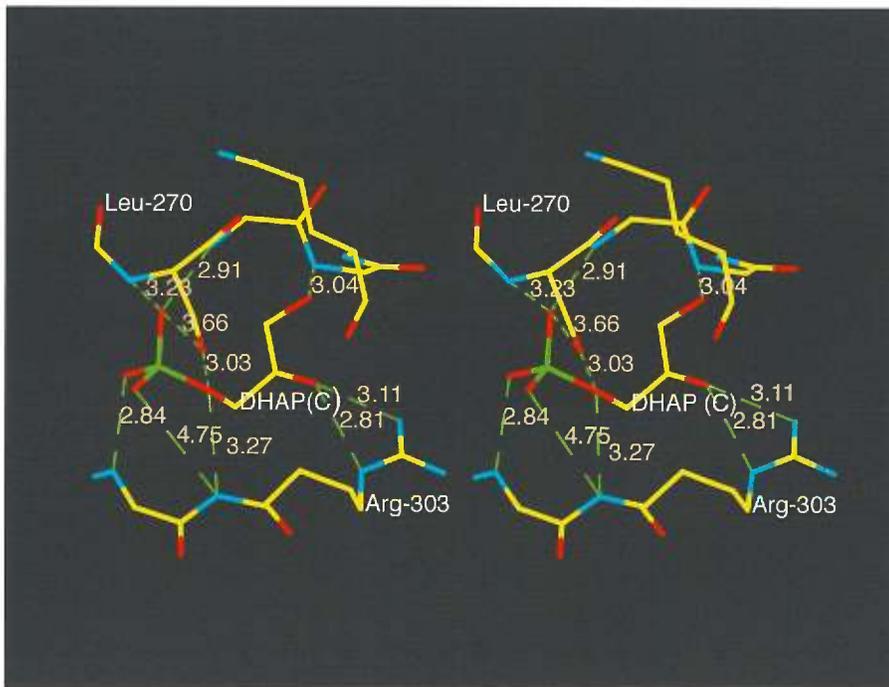
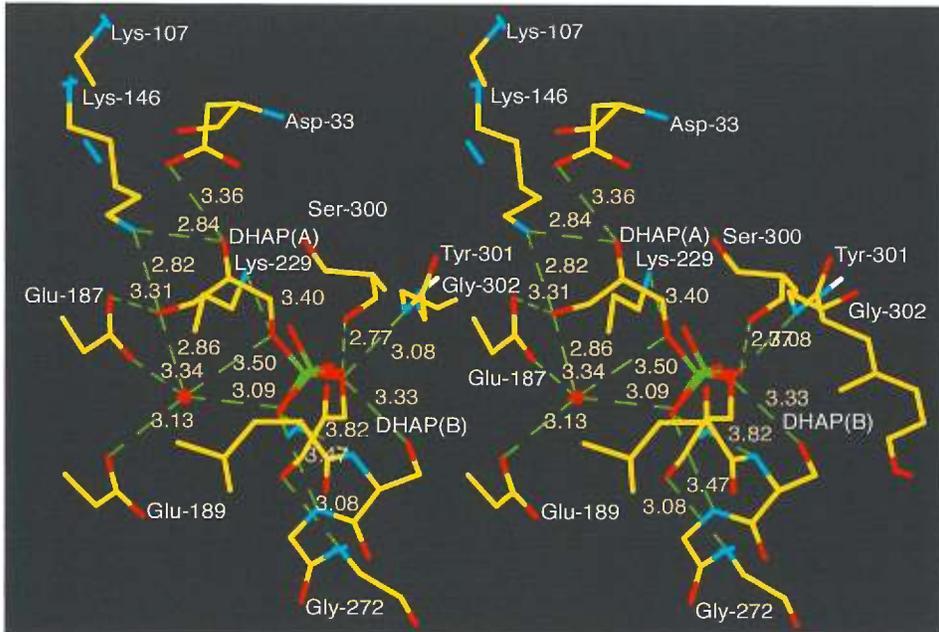


Figure 6 : Interactions entre le DHAP et les résidus du site actif de l'aldolase du muscle de lapin dans le site A et B (haut) de la sous-unité 1 et C (bas) de la sous-unité 2.

1.4.3 Interactions du DHAP

Le DHAP dans le site actif de l'aldolase native se retrouve sous trois conformations A, B et C (Blom et Sygusch., 1997). Ces trois conformations se situent dans différents emplacements dans le site actif. Elles correspondent à trois conformations adoptées par le DHAP lors de son passage de l'extérieur de la protéine vers l'intérieur du site actif. Les résidus à l'extrémité du site actif agissent comme un filtre des différentes espèces du DHAP présentes en solution, dont le groupement phosphate peut être soit mono, soit dibasique. Selon le site qu'il occupe et les interactions qu'il établit avec les résidus, le groupement phosphate du DHAP ne peut avoir qu'un état de protonation bien déterminé. En effet, l'interaction du groupement phosphate avec le carbonyle de la Ser-300 montre qu'au moins l'un des groupements oxygènes liés au phosphate est sous forme hydroxyle. La structure tridimensionnelle du complexe de l'aldolase-DHAP montre que c'est seulement la forme monobasique du DHAP qui arrive jusqu'à la conformation A (Blom et Sygusch., 1997). Même si le site C, accepte la forme mono et dibasique du DHAP, seule la forme monobasique arrive au site B et à l'intérieur du site actif. Ceci explique que bien que la forme dibasique est la plus dominante en solution à pH 7, les résidus dans le site B agissent comme un filtre qui ne permet qu'à la forme monobasique du DHAP d'être catalysée par l'aldolase.

La forme A du DHAP dans la sous-unité 1 est dans une conformation favorable à la formation du complexe Michaelis entre celui-ci et l'aldolase. Le complexe Michaelis correspond à la première étape du mécanisme enzymatique (Figure7).

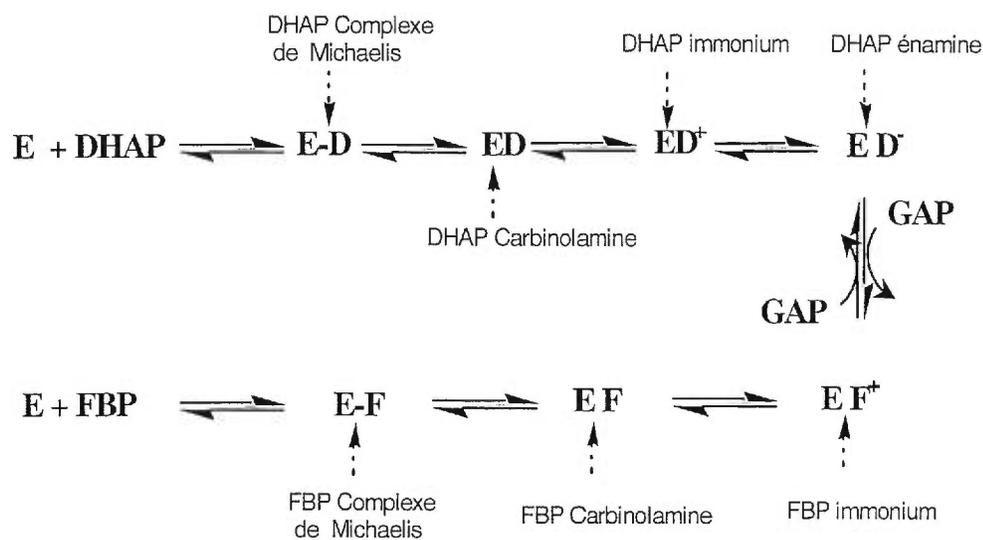


Figure 7 : États intermédiaires du DHAP (D) et du substrat FBP (F) catalysés par l'aldolase de classe I (E).

Les données structurales montrent que la distance et l'orientation du DHAP, par rapport aux résidus du site actif, sont bien spécifiques et qu'elles sont étroitement liées à son efficacité catalytique (Figure 6). En effet, la Lys-229 possède une chaîne latérale proche du carbone C_2 du carbonyle du DHAP qui lui permet d'effectuer l'attaque nucléophile nécessaire à la formation de la base de Schiff. La catalyse nécessite l'orientation du groupement phosphate du substrat de manière stéréochimiquement favorable à cette attaque nucléophile par la Lys-229 et aux étapes subséquentes de la catalyse, c'est-à-dire que l'orientation du groupement ammonium déprotonné de la Lys-229 doit se faire selon la face (*re*) du carbonyle du carbone C_2 du DHAP (Figure 8). Il a été démontré, par réduction du DHAP au borohydrure de sodium et par son hydrolyse, que seule la face (*re*) de la base de Schiff est exposée au solvant (Dilasio et al., 1977).

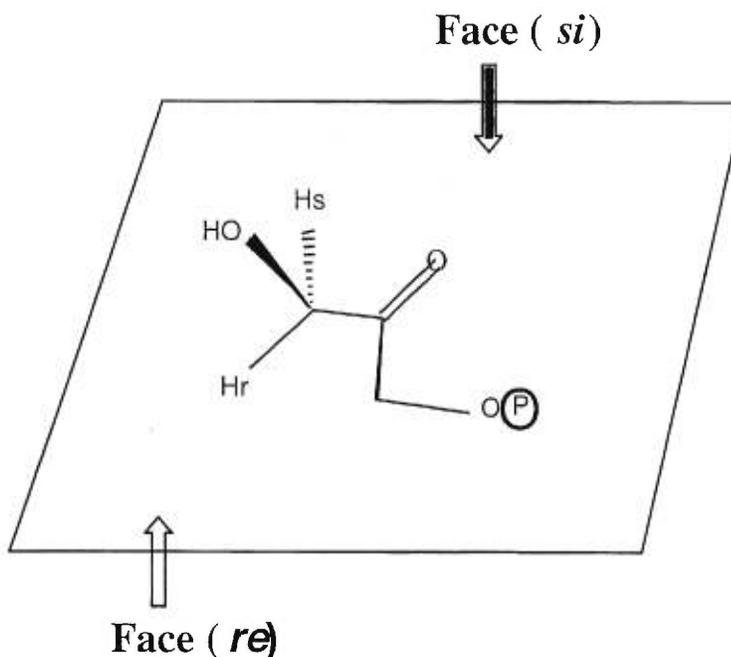


Figure 8 : Faces (*re*) et (*si*) du carbonyle du DHAP

Le complexe Michaelis DHAP-aldolase révèle des interactions entre la Ser-271, la Gly-272 et la Gly-302 et le groupement phosphate du DHAP. Ce dernier a aussi une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de la Ser-300. Ces deux interactions mettent en évidence la préférence de l'aldolase pour la forme monobasique du DHAP (site A). D'autres résidus du site actif, tels que la Lys-146, Glu-187 et l'Asp-33, stabilisent le DHAP (site A). Ils interagissent avec une molécule d'eau située entre les chaînes latérales de ces résidus et le DHAP et contribuent également à la stabilisation de ce dernier dans son site A.

Plusieurs autres résidus, situés dans le site actif, peuvent être candidats aux étapes de la catalyse. C'est le cas du Glu-187 qui est probablement impliqué dans la capture de l'hydrogène de l'hydroxyle O₄ qui aboutit au clivage du substrat FBP (Figure 3). La Lys-107 qui joue un rôle dans la liaison du groupement phosphate du carbone 6

du FBP (Anai et al., 1973), interagit avec le groupement carboxylate de l'Asp-33 pour neutraliser sa propre charge et éviter ainsi la répulsion avec la Lys-146 (Blom et Sygusch., 1997).

1.4.4 Partie C-terminale

La partie C-terminale de l'aldolase (résidus 344 à 363) comporte majoritairement des glycines et des alanines, ce qui favorise sa flexibilité et lui permet d'adopter différentes conformations dans chacune des sous-unités (Figure 9). Dans les deux premières sous-unités, la partie C-terminale est orientée vers la surface du site actif. Par contre, dans les sous-unités 3 et 4, elle est orientée vers son propre site actif. Bien qu'elle soit active dans le sens du clivage du FBP, la forme cristalline à partir de laquelle la structure de l'aldolase du muscle a été déterminé, libère difficilement le produit de la réaction (DHAP) (Sygusch et al., 1984). La compréhension des différents modes de fixation du DHAP dans le site actif est reliée à ses interactions avec les résidus de la partie C-terminale (Blom et Sygusch., 1997) et ne peut se faire sans une analyse détaillée des conformations adoptées par celle-ci.

La partie C-terminale participe au mécanisme catalytique de l'aldolase d'une manière indéfinie. En effet, un traitement protéolytique des aldolases de classe I engendre le clivage des cinq derniers résidus de la partie C-terminale et conduit à une activité résiduelle de 5 à 7 % (Rutter., 1964). Ces résultats démontrent l'implication de cette partie dans l'activité catalytique et principalement celle du dernier résidu, la Tyr-363, impliqué dans la formation de l'énamine (Biellmann et al., 1969). Le clivage de la partie C-terminale, sous l'action des protéases, engendre la perte d'activité vis-à-vis du FBP lorsqu'il arrive jusqu'au résidu Ser-356 et vis-à-vis du F1P lorsque le clivage comprend les 6 résidus en amont de cette histidine (Humphreys et al., 1986). Cette protéolyse influence l'étape d'échange du proton pro-S du DHAP avec le solvant lors de la formation de l'énamine (Berthiaume et al, 1991). Elle indique aussi que la protonation de l'énamine devient l'étape la plus lente (Rose et al., 76).

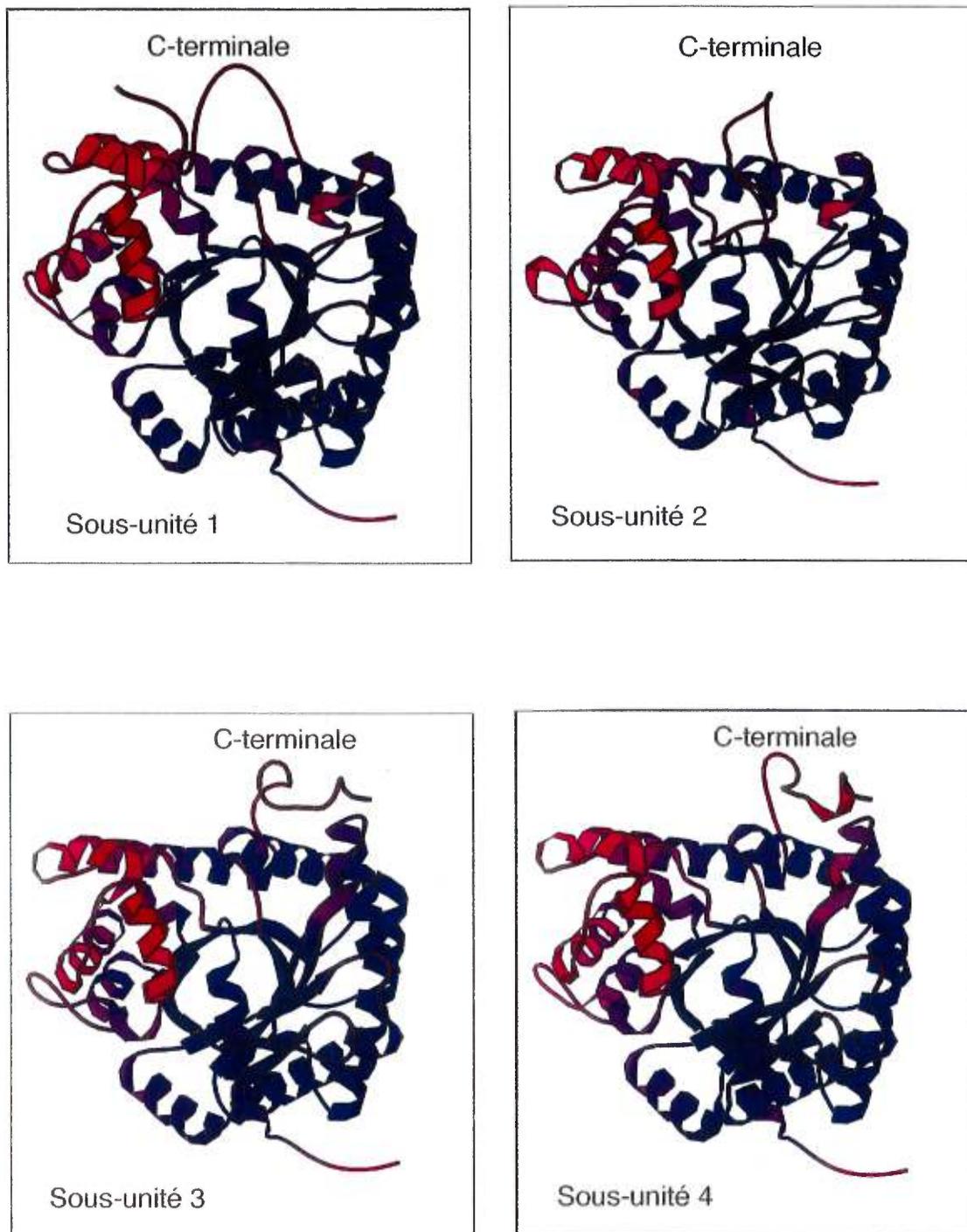


Figure 9 : Les différentes conformations adoptées par la partie C-terminale dans la sous-unité 1, 2, 3 et 4 chez l'aldolase du muscle de lapin

En plus de l'importance de l'analyse du site actif et de la partie C-terminale, l'analyse de l'état oligomérique a été intéressante. En effet, l'aldolase du muscle est tétramérique et possède deux ions sulfates qui interagissent entre les deux premiers monomères. L'état oligomérique de l'aldolase contribue davantage à sa thermostabilité qu'à son activité catalytique (Beernink et al., 1992). L'interaction entre les différents domaines du tétramère se fait grâce aux résidus Asp-128 et Gln-125 situés de part et d'autre de chaque monomère. La répartition des charges à la surface d'un monomère permet d'identifier des régions fortement chargées positivement.

1.4.5 Site de fixation de l'ion sulfate

Dans les sous-unités 1 et 2 de l'aldolase du muscle de lapin, cet ion occupe un site équivalant à celui qui est occupé par la Tyr-363 des sous-unités adjacentes 3 et 4 (Figure 10). Ce site est situé à la surface de la protéine et favorise probablement la stabilisation du tétramère. Les ions sulfates proviennent principalement de la cristallisation de l'enzyme dans le sulfate d'ammonium. On ne peut assigner aux deux sites de fixation de l'ion sulfate chez l'aldolase qu'un rôle structural. La présence de cet ion suggère qu'on peut lui assigner une fonction similaire à celle de la Tyr-363 soit l'interaction entre monomères.

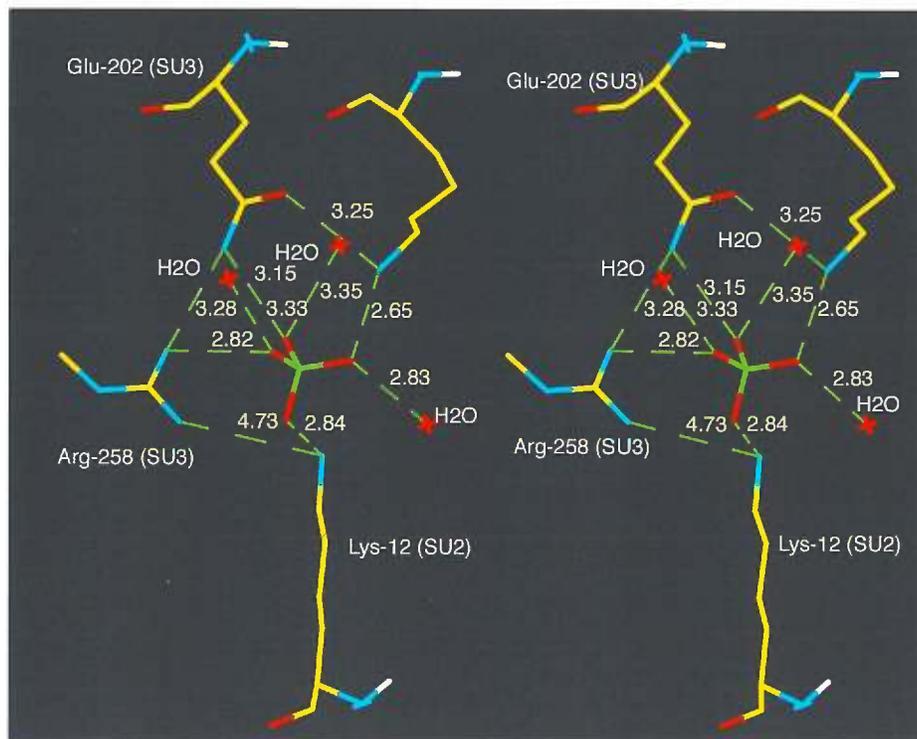
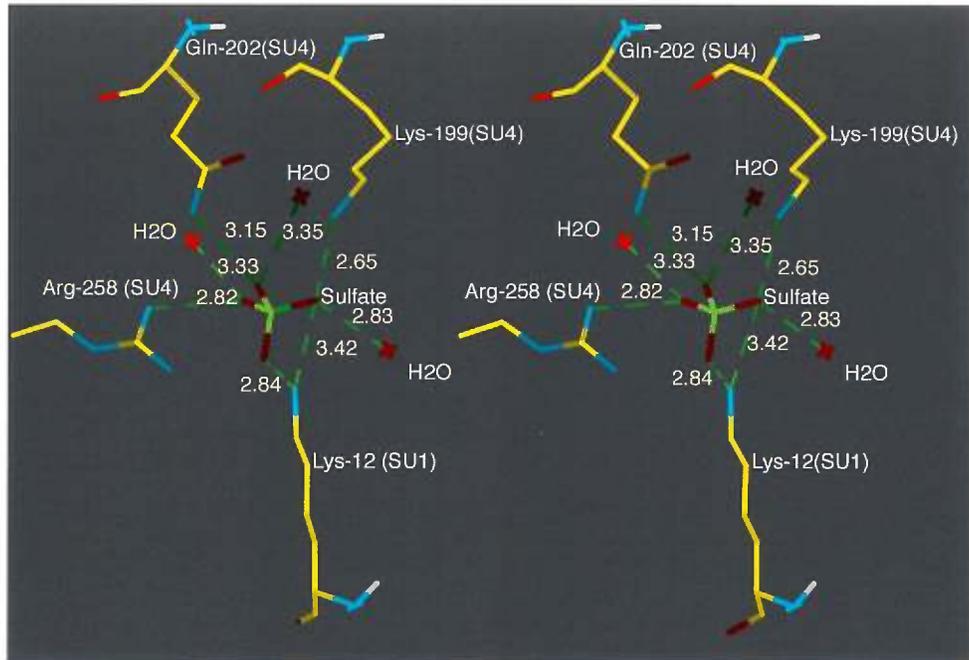


Figure 10 : Site de liaison de l'ion sulfate chez l'aldolase du muscle de lapin dans le site 1 (haut) et le site 2 (bas) (Blom et Sygusch., 1997).

1.5 Certains complexes de l'aldolase du muscle de lapin

Si la structure du complexe de l'aldolase du muscle avec le DHAP a été résolue, il reste à déterminer la structure de celle-ci avec son substrat, le FBP. Ce complexe permettra de déterminer les résidus qui stabilisent le FBP dans le site actif. La structure des inhibiteurs synthétisés contre l'aldolase de classe I peut, grâce aux connaissances structurales des complexes aldolase–inhibiteurs, être améliorée (Figure 11).

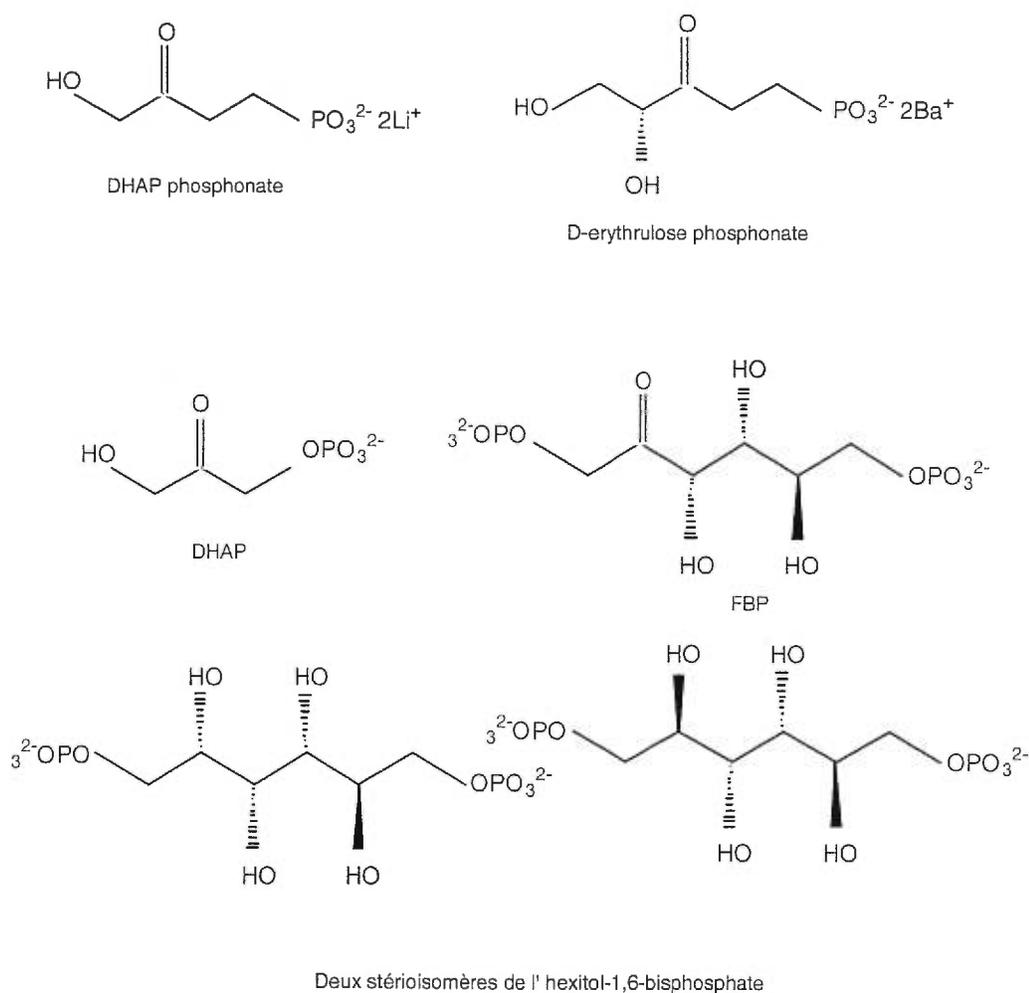


Figure 11 : Le substrat FBP et les inhibiteurs utilisés pour la formation des complexes avec l'aldolase du muscle de lapin.

Les dérivés phosphonates sont utilisés parce que contrairement aux phosphates, ils ne sont pas dégradés par les phosphatases. Ils peuvent avoir une durée de vie plus longue que les inhibiteurs contenant des groupements phosphates. L'hexitol-1,6-bisphosphate, quant à lui il existe sous forme de deux énantiomères

Inhibiteurs	Ki (μM)	Techniques	Références
DHAP	6.4	Tamis moléculaire	Grazi 1973
Hexitol-1,6-bisphosphate	0.45	Cinétique enzymatique	Midelfort 1976
DHAP-phosphonate	100	Cinétique enzymatique	Page 1995
D-Erythrulose-1-phosphonate	110	Cinétique enzymatique	Page 1995

Tableau I : Liste de certains inhibiteurs utilisés dans l'étude structurale des complexes de l'aldolase du muscle de lapin.

1.6 Projet de recherche doctoral

Au niveau du site actif, l'emplacement des résidus, la nature des interactions qu'ils établissent, et les molécules d'eau jouent un rôle très important dans la catalyse enzymatique. La cristallographie est l'outil qui permet de visualiser en direct la structure tridimensionnelle d'une molécule et de déceler la présence et l'implication de résidus, de ligands et même de molécules d'eau dans la fonction des protéines. En parallèle, le génie génétique et l'enzymologie permettent de compléter ces informations structurales.

La présente étude est focalisée sur trois importants domaines : la partie cinétique, structurale et analytique. Elle porte sur le mécanisme de l'aldolase du muscle de lapin native et sur certains de ses mutants.

L'étude de l'aldolase du muscle de lapin mutante a pour but d'apporter des informations supplémentaires sur le rôle de plusieurs résidus dans son mécanisme catalytique, de révéler les changements conformationnels engendrés par les mutations et l'impact sur le site actif et la partie C-terminale. L'intérêt porté à la partie C-terminale est lié aux conformations variables qu'elle adopte qui sont dues principalement à la diversité des résidus qui la constituent, chez les différentes aldolases. Cette diversité permet de cibler cette partie afin de synthétiser des inhibiteurs contre certaines maladies (malaria, trypanosomiase). La trypanosomiase, grave maladie tropicale, est causée par un protozoaire flagellé (*Trypanosoma brucei*). Dans son cycle de vie, ce parasite se différencie sous plusieurs formes évolutives qui diffèrent dans leur métabolisme (Fairlamb et al., 1986). Chez les mammifères, on trouve la forme sanguine, dont la seule source énergétique vitale est la glycolyse. Quant à la malaria, elle est causée par le parasite *Plasmodium falciparum*. Sous la forme sanguine, ce parasite nécessite la production d'énergie qui comme dans le cas de *Trypanosoma brucei* provient uniquement par la glycolyse. Les enzymes glycolytiques, et par conséquent l'aldolase, représentent une cible thérapeutique. Ainsi, une meilleure connaissance du mécanisme enzymatique des aldolases peu permettre la synthèse spécifique d'un inhibiteur puissant qui pourra induire la destruction du parasite, et cela, sans toxicité élevée pour le mammifère hôte.

Dans ce contexte, des études sur les mutants de l'aldolase du muscle ont été entamées. A ce jour, les seules études structurales rapportées concernent les aldolases natives de classe I et II citées précédemment. Dans le cas des mutants de la classe I, seules des études cinétiques ont été entreprises et uniquement sur certains résidus du site actif (Asp-33, Lys-146) (Morris et Tolan., 1993, Morris et Tolan., 1994). En parallèle, les expériences effectuées par dichroïsme circulaire, gel-filtration et diffusion en solution ne donnent que des informations quantitatives sur leur forme structurale. Toutefois, étant donné que ces études se sont avérées insuffisantes pour déterminer avec précision le rôle des résidus clés, des études cinétiques ont été entamées dans notre laboratoire, par D. Demoissac dans le cadre du sujet d'étude de sa maîtrise sur certains mutants de l'aldolase (Demoissac., 1995). Elles ont révélé l'implication de

certains résidus dans le mécanisme enzymatique et ont permis de proposer plusieurs hypothèses quant à leur rôle.

Afin de compléter la caractérisation cinétique des mutants de l'aldolase du muscle, les profils de pH des mutants E187Q et R258M sont réalisés. Ensuite une nouvelle approche de cinétique d'échange isotopique sur les mutants cités dans le tableau II (K229M, K146M, K146A, D33S, D33N, S271A, E187Q et E187A) va montrer l'identité du résidu impliqué dans l'étape d'échange de l'hydrogène avec l'énamine.

Les mutants étudiés dans ce projet sont résumés dans le tableau II. Le mécanisme enzymatique de chaque mutant, diffère de celui de l'aldolase native, est analysé et interprété par l'étude cinétique et structurale. L'analyse des interactions entre résidus du site actif de chaque mutant permet de mieux connaître la nature des acides aminés nécessaires à l'interaction avec le substrat. Elle permet également de déterminer les paramètres qui gèrent la fonction catalytique, aussi faible soit-elle, et de définir la nature des étapes réactionnelles limitantes. Cette étude va nous permettre de vérifier les aspects structuraux qui sont aussi bien reliés à la stabilité dans le cas de l'ion sulfate qu'à la fonction de l'aldolase dans le cas des résidus du site actif.

La mutation de l'arginine en position 258 en méthionine est caractérisée par la cinétique enzymatique afin de vérifier le rôle de ce résidu dans l'activité enzymatique. L'interaction de l'Arg-258 avec la Tyr-363 dans les sous-unités 1 et 2 maintient la partie C-terminale dans une conformation qui lui permet d'interagir avec le site actif de ces deux sous-unités.

Les lysines ciblées par mutagenèse dirigée sont la Lys-146, la Lys-229 et la Lys-107. Le changement d'une lysine pour une méthionine permet de conserver le même volume de Van Der Waals, tout en supprimant le groupement amine réactionnel. Les mutants K146M, K107M et K229M seront analysés principalement

par cinétique d'échange isotopique. Quant au mutant K146M, même s'il a été cristallisé, ses données cristallographiques ne sont pas exploitables.

Ces résultats cinétiques vont guider notre choix des mutants dont les structures tridimensionnelles seront déterminées par diffraction aux rayons X. Ce choix a été également guidé par des contraintes expérimentales dues à la qualité des données cristallographiques qui nous ont permis de caractériser uniquement la structure des mutants K229M, K107M, E187Q et E187A pour les raisons citées ci-dessous :

1.6.1 Mutant E187A

L'étude structurale du mutant E187A nous permet d'analyser les facteurs responsables de la réorganisation des résidus du site actif suite à la création d'une cavité due à la mutation du Glutamate en position 187 en alanine. Ce mutant préalablement caractérisé cinétiquement révèle l'existence d'un important changement des positions des résidus du site actif et l'existence probable d'une molécule d'eau catalytique (Demoissac., 1995).

Les résultats cinétiques du mutant E187A et E187D (Demoissac, 1995) montrent un déplacement de l'activité catalytique vers les pH acides. Ceci nous montre une diminution des pKa des résidus ou intermédiaires réactionnels impliqués dans la catalyse. En effet, dans le cas de l'acétoacétate décarboxylase, Westheimer a proposé que la proximité de deux lysines 115 et 116 diminue le pKa de la Lys 115 catalysant la formation de la base de Schiff avec le substrat (Coutts, 1967). Cette hypothèse suppose que grâce à la proximité de ces deux lysines du site actif, le pKa de celle qui établit la base de Schiff avec le substrat baisse de 4 unités. L'avantage de cette diminution de pKa est la présence de l'ammonium de la lysine formant la base de Schiff dans un état déprotoné qui permet à l'enzyme d'être active, dans une large gamme de pH (pH proches de ceux correspondant à la neutralité de cette lysine). Dans le cas de l'aldolase, les deux lysines ciblées sont la Lys-146 et 229. La Lys-229 est impliquée dans la formation de la base de Schiff avec le substrat et la Lys-146 qui est la lysine la plus

proche de celle-ci dans le site actif. Ces deux lysines, en l'absence du résidu anionique, le Glu-187 qui interagit simultanément avec leur chaîne latérale, devraient subir une répulsion due à leur groupement ϵ -ammonium qui est habituellement chargé positivement à pH 7. Cette structure conduit à d'importantes conclusions quant à l'état d'ionisation de ces deux lysines aussi bien dans ce mutant que chez l'aldolase native.

L'étude cinétique du mutant E187A est réalisée également dans le but de mettre en évidence la présence d'une molécule d'eau possiblement localisée dans la cavité créée par la mutation et qui tiendrait le rôle du Glu-187 dans le site actif. La présence de cette molécule d'eau permettrait d'expliquer les résultats cinétiques du mutant E187A.

1.6.2 Mutant E187Q

La mutation du Glutamate en position 187 en glutamine vient compléter la précédente étude effectuée sur le mutant E187A pour vérifier l'hypothèse de Westheimer. En effet, la glutamine permet de garder le même volume de Van Der Waals que le glutamate en position 187 chez l'aldolase native, mais sans le pouvoir d'effectuer des échanges d'hydrogènes. L'étude cinétique de ce mutant permet de connaître l'effet de la mutation sur l'activité enzymatique. Cette substitution apportera, grâce à l'analyse des interactions d'acides aminés avoisinants une étude supplémentaire sur l'état d'ionisation des lysines 229 et 146.

1.6.3 Mutant K229M

Le mutant K229M permet de déterminer la relation entre le rôle enzymatique de cette lysine du site actif et les changements conformationnels provoqués par la mutation. La mutation de la Lys-229 en méthionine permet d'acquérir des connaissances supplémentaires sur l'hypothèse de l'existence de la Lys-229 sous une forme neutre chez l'aldolase native ; situation qui serait favorable à la réaction enzymatique en raison du rôle tenu par cette lysine. L'étude du mutant K229M vise à vérifier l'implication de ce résidu dans la formation de la base de Schiff avec le substrat,

résultat déjà établi dans la littérature. Mais il sera surtout utilisé dans l'étude structurale des complexes de l'aldolase avec son substrat FBP et certains de ces inhibiteurs que nous citerons par la suite. En effet, le mutant K229M permet aussi la cocrystallisation avec le FBP qui pourrait être alors stabilisé dans le site actif sans être transformé. La Lys-229 mutée, le FBP ne peut donc se lier d'une manière covalente dans le site actif du mutant K229M.

1.6.4 Mutant K107M

Finalement, l'information structurale déterminée à partir du mutant K107M permet de déceler la nature de son implication dans l'activité catalytique et son affinité par rapport au substrat. En effet, ce mutant affecte non seulement l'activité de l'enzyme mais aussi l'affinité pour son substrat, le FBP (Demoissac., 1995).

Mutant	Acide aminé	Position	Mutation
de l'aldolase native			
K107M	Lysine	107	Méthionine
K146M	Lysine	146	Méthionine
K229M	Lysine	229	Méthionine
E187Q	Glutamate	187	Glutamine
E187A	Glutamate	187	Alanine
D33N	Aspartate	33	Asparagine
D33S	Aspartate	33	Serine
R258M	Arginine	258	Méthionine
K146A	Lysine	146	Alanine
S271A	Serine	271	Alanine

Tableau II : La liste des mutants de l'aldolase du muscle de lapin étudiés.

1.7 Méthodes expérimentales élaborées

Différentes approches sont utilisées pour l'étude de la contribution des résidus du site actif dans la stabilité et la fonction de l'aldolase. Celles-ci se divisent en deux parties principales :

- La première vise à palier au caractère incomplet des informations concernant la nature de l'implication des résidus du site actif, en passant par la surexpression de l'aldolase native et de certains mutants et la détermination de leur caractérisation cinétique. Cette étude débute par la purification des différentes enzymes qui seront utilisées dans le volet cinétique et permet à cette approche d'analyser des mutants au niveau des paramètres cinétiques (A_S , K_m , k_{cat}/K_m), grâce aux profils de pH qui nous renseignent sur les pKa qui correspondent aux changements ioniques des résidus impliqués dans la liaison et/ou de l'activité vis-à-vis du substrat FBP. La cinétique d'échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$ de l'hydrogène pro-S en C_3 du DHAP par ces mutants a été utilisée dans le but de dépasser les limitations dans l'interprétation des résultats cinétiques. En effet, cette technique permet d'analyser une seule étape du mécanisme catalytique qui est le passage du DHAP de l'intermédiaire base de Schiff à celui de l'énamine. Cette technique d'échange isotopique en présence du tritium jumelée avec celle du deutérium (Azéma, non publié) et celle de la détermination des intermédiaires de la réaction enzymatique en présence du DHAP grâce au marquage isotopique au ^{32}P (Sygusch et Beaudry, non publié) va permettre d'identifier le/ou les résidus impliqués dans l'étape d'échange de l'hydrogène du carbone C_3 du DHAP catalysé par l'aldolase.

- La seconde partie, porte sur la cristallisation et la détermination des structures tridimensionnelles par diffraction aux rayons X. La combinaison des connaissances obtenues à partir de ces deux méthodes aboutit à des résultats qui vont compléter le mécanisme catalytique de l'aldolase du muscle de lapin.

1.7.1 Cinétique enzymatique

Les mutants qui sont caractérisés par cinétique enzymatique sont analysés grâce aux mesures de la variation de l'activité enzymatique vis-à-vis du substrat (FBP) en fonction du pH. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer les paramètres cinétiques (l'activité spécifique (A_s), la constante Michaelis (K_m) ainsi que les états d'ionisation du substrat et/ou de l'enzyme nécessaires à la catalyse. Le comportement cinétique des mutants de l'aldolase est le critère essentiellement considéré pour une éventuelle étude structurale.

1.7.2 Cinétique d'échange isotopique

La capacité d'une protéine à échanger un proton avec le solvant lors d'une réaction catalytique nous offre l'opportunité d'utiliser les échanges isotopiques pour explorer le mécanisme catalytique de certaines enzymes. Ce type d'étude a été utilisé dans le cas de plusieurs enzymes (Paul F. Cook et al., 1994), entre autres pour la triose phosphate isomérase (E.C.5.3.1.1.) (Alston et al., 1996), qui a pour substrat le DHAP. Dans le cas de l'aldolase, la réaction enzymatique avec le DHAP se fait par échange de protons entre le proton pro-S en C₃ du DHAP et ceux du solvant catalysé par un résidu du site actif dont l'identité reste encore indéfinie. Ce point constitue donc notre principale motivation dans la présente étude.

Nous avons utilisé le DHAP au lieu du substrat FBP parce que celui-ci génère deux produits, le DHAP et le GAP ce qui augmente le nombre de variables reliées au nombre de protons échangés aux différents stades de la catalyse. En effet, l'échange de protons entre le FBP et le solvant est catalysé par l'aldolase lors de la formation de l'ion immonium, du clivage de la liaison C₃-C₄ et de l'hydratation du DHAP sous sa forme de base de Schiff (Figure 3). L'utilisation du DHAP devient nécessaire puisqu'il échange un seul proton avec le solvant lors d'une seule étape catalytique avec l'aldolase.

Lors de la réaction enzymatique, l'aldolase catalyse l'échange de l'hydrogène en position pro-S du carbone C₃ du DHAP avec le solvant (Figure 12). Ce proton se trouve dans un plan perpendiculaire à celui formé par les carbones C₁ à C₃ du DHAP et se maintient dans cette position grâce à l'environnement créé par les résidus du site actif pour favoriser son arrachement (Figure 6). Nous sommes intéressés à l'étape d'échange de protons entre l'aldolase et le DHAP pour connaître les facteurs qui gèrent cette réaction.

La réaction d'échange de proton comparée à celle de l'échange du tritium ³H avec le solvant catalysé par l'aldolase peut changer de plusieurs ordres de grandeur. Cette augmentation de la vitesse peut prendre une grande ampleur surtout lorsque le proton échangé se fait lors du passage entre deux états de transitions (états intermédiaires) et aboutit à un effet isotopique primaire. En effet, la comparaison de la vitesse d'échange de deux isotopes tels que le deutérium et le tritium avec le solvant permet de déterminer la nature de l'effet isotopique (primaire ou secondaire). Les études de l'échange de protons entre le DHAP sous forme de base de Schiff et le solvant a été déterminé uniquement dans le cas de l'aldolase de type sauvage (Rose et Rieder., 1957).

La difficulté d'établir la nature et le degré de ce transfert de proton catalysé par l'aldolase, nous amène à effectuer les cinétiques d'échange isotopique du ³H/¹H du DTAP (solution du DHAP monotritié) dans l'eau aussi bien pour l'aldolase native que pour ses mutants. Ces expériences jumelées avec des cinétiques d'échange isotopique ¹H/²H effectuées sur l'aldolase du muscle de lapin native et mutante (Azema, non publié), nous permettront de déceler la présence ainsi que l'ampleur d'un effet isotopique si ce dernier existe. Étant donné que le nombre de DTAP qui se lie à l'enzyme est proportionnel au nombre de protons échangés, il est possible de suivre cette réaction par la diminution de la quantité de DTAP ou de l'eau tritiée (T₂O) formée. Le DTAP ajouté au complexe aldolase/DHAP remplace en fonction du temps le DHAP et forme la base de Schiff puis l'énamine, après libération du tritium sous forme d'eau tritiée. La réaction catalysée par l'aldolase avec le DTAP est représentée dans la figure 12.

Afin de connaître l'efficacité catalytique de l'arrachement du proton pro-S de la base de Schiff qui conduit à la formation de l'énamine, il est nécessaire de mesurer le nombre réel de base de Schiff formé entre le DHAP et l'aldolase à l'équilibre. Ceci va nous permettre de connaître le/ou les résidus impliqués dans cette étape.

1.7.2.1 Intermédiaires de la réaction enzymatique avec le DHAP

Les intermédiaires réactionnels qui n'ont pas de propriétés spectroscopiques particulières sont difficilement analysés. Ce problème pour l'aldolase est résolu par isolation des intermédiaires par précipitation acide (Kuo et al., 1984; Rose et al., 1987). La détermination de la concentration des intermédiaires catalysés par l'aldolase en présence du DHAP est réalisée grâce au marquage isotopique du FBP et DHAP avec le ^{32}P (Sygusch et Beaudry, non publié). Ce marquage nous permet de déterminer la concentration de base de Schiff et du carbanion formé.

La vitesse d'échange isotopique en présence du tritium tient compte de la quantité totale d'enzyme et non de celle qui forme la base de Schiff. Afin de corriger cette sousestimation de la vitesse et de déterminer le coefficient d'efficacité de l'aldolase, nous avons tenu compte de la quantité réelle d'enzyme sous forme de base de Schiff. Ces intermédiaires, sous forme complexe covalente sont assez stables dans les solutions acides et survivent à la dénaturation qui favorise leur isolation.

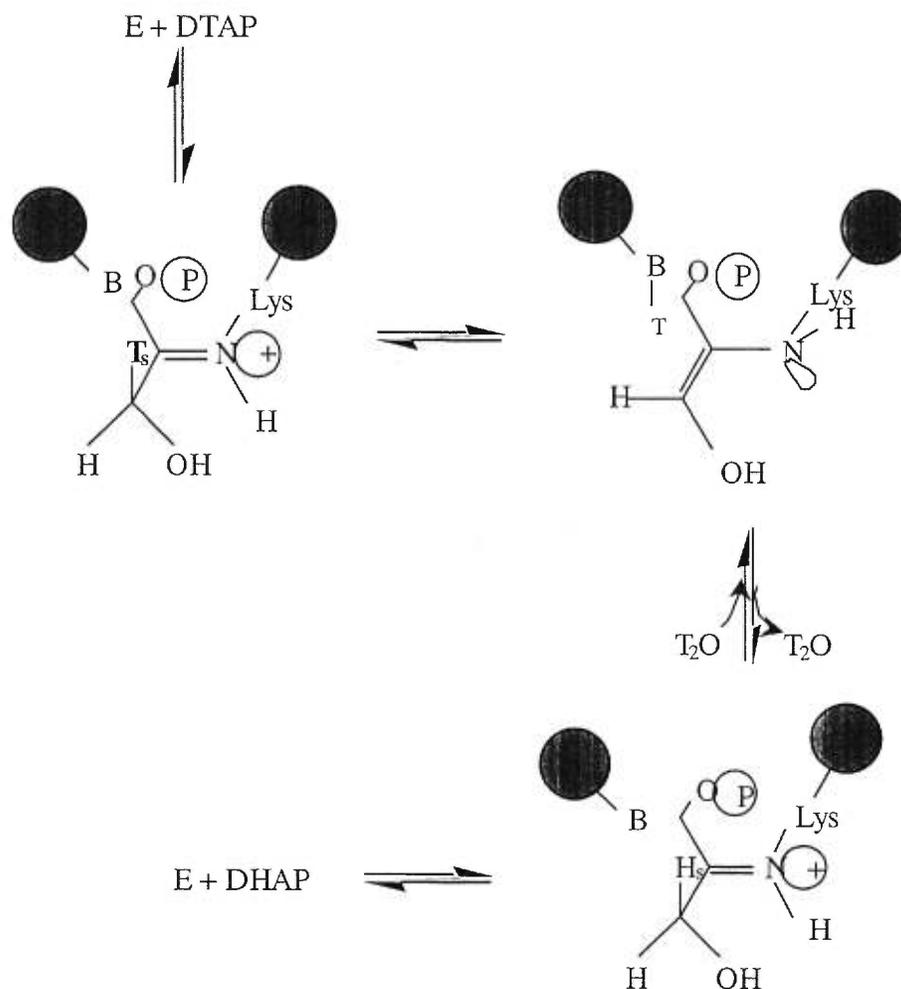


Figure 12 : La réaction d'échange isotopique du $^3H/^1H$ en position pro-S du DTAP catalysée par l'aldolase du muscle de lapin (E) dans l'eau.

Avec B un résidu basique du site actif de l'aldolase et T_s le tritium fixé en position pro-S du DTAP.

1.7.2.2 Cinétique d'échange isotopique dans D_2O

Les expériences d'échange isotopique en présence du tritium et du deutérium vont nous permettre de caractériser la même réaction enzymatique mais avec deux approches différentes. Ils vont aussi nous permettre de connaître la nature de l'effet

de ces deux isotopes sur l'aldolase native et mutante. Elle permet de mettre en évidence l'effet des mutations sur les vitesses d'échanges $^1\text{H}/^2\text{H}$, la stéréochimie mise en jeu (hydrogène pro-S et/ou pro-R) ainsi que la mise en place de réactions secondaires. Cette expérience, réalisée au laboratoire de LCMB (Azema non publié, 1999) (Université de Toulouse), par résonance magnétique nucléaire (RMN), caractérise également l'échange du proton $^1\text{H}/^2\text{H}$ pro-S du DHAP dans D_2O catalysé par l'aldolase native et mutante.

1.8 Cristallisation

Les mutants ainsi que l'aldolase native ont été cristallisés dans plusieurs conditions afin d'obtenir de nouvelles formes cristallines qui permettront l'obtention des complexes de l'aldolase avec son substrat et certains de ses inhibiteurs. Des essais de cristallisation en microgravité ont également été effectués grâce aux missions spatiales avec l'agence spatiale canadienne (CSA) par l'intermédiaire de l'agence spatiale américaine (NASA) dans le cadre de l'étude de l'effet de la microgravité sur les cristaux de protéines.

1.9 L'étude structurale par cristallographie aux rayons X

Les structures déterminées par cristallographie aux rayons X sont celles de E187A, E187Q, K229M, K107M, complexe K229M-Hexitol-1,6-bisphosphate et le complexe aldolase-Hexitol-1,6-bisphosphate. Les autres mutants (D33S, D33N, K146M, S271A et R258M) ont également été cristallisés ; cependant, les données cristallographiques obtenues sont difficilement exploitables.

Cette étude structurale débute par la cristallogénèse. L'enzyme purifiée (rendement moyen de 30 mg/L de culture de cellules) cristallise dans une forme isomorphe à celle de l'aldolase native. Cette dernière préserve son activité dans le cristal et correspond à la conformation active de l'aldolase (Sygusch et al.,1984). Les données cristallographiques collectées à partir de ces cristaux ont permis la résolution de ces structures dont l'affinement a permis d'obtenir des modèles cristallographiques de haute qualité. Ces mutants sont analysés ensuite en détail, aussi bien au niveau des sites

actifs et des parties C-terminales que des régions ayant subi des changements conformationnels. Comparées à la structure native, les structures des enzymes mutantes ont permis de voir l'effet de chaque mutation sur la structure de l'enzyme et, plus précisément, sur les interactions qu'elles influencent. Parallèlement, un certain nombre d'essais de cristallisation au laboratoire et en microgravité de l'aldolase native et mutant, ont été entamés afin de trouver de nouvelles formes cristallines pour la détermination des complexes de l'aldolase avec certains inhibiteurs. Contrairement à la structure de l'aldolase native, tous ces mutants ne possèdent pas de ligand dans leur site actif. L'analyse structurale comparative entre l'aldolase native et les mutants cités précédemment permet de connaître les changements conformationnels qui régissent la capture du DHAP dans le site actif. Elle permet aussi la mise en évidence du lien entre le site actif et la conformation adoptée par la partie C-terminale.

1.10 Complexes de l'aldolase avec son substrat et certains inhibiteurs

L'étude des complexes de l'aldolase native et mutante avec certains inhibiteurs a été ciblée dans le volet structural. Les inhibiteurs étudiés sont cités dans le tableau I. Les dérivés phosphonates ont été synthétisés et étudiés au laboratoire LCMB (Université de Toulouse). La synthèse de l'hexitol-1,6-bisphosphate a été réalisée à partir de la réduction du substrat FBP par le borohydrure de sodium (Ginsburg et Mehler., 1966). Les composés, DHAP-phosphonate et D-erythrose phosphonate, sont plus stables que le DHAP et D-erythrose phosphate. En effet, ces molécules avec des groupements phosphates, sont dégradées par les phosphatases dans l'organisme. Ces inhibiteurs sont donc étudiés pour leur stabilité et toxicité (Page., 1995). Ils sont des inhibiteurs compétitifs du substrat FBP dont l'interaction dans le site actif sera d'un grand intérêt scientifique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Purification de l'aldolase du muscle de lapin native et mutante

2.1.1 Introduction

L'étude de différentes mutations va nous permettre de déterminer l'effet de certains groupements des résidus du site actif sur la catalyse enzymatique. En résumé, nous allons vérifier le rôle de la Lys-229 dans la formation de la base de Schiff, de l'Asp-33, la Lys-146 et le Glu-187 dans la stabilisation des intermédiaires de la réaction catalytique et de la Lys-107 et Arg-258 dans la liaison du groupement phosphate du FBP. Cette étude débute par l'expression et la purification de l'aldolase native et mutante (Tableau II). Les protéines purifiées sont utilisées dans les études cinétiques et structurales.

2.1.2 Expression de l'aldolase

Les mutants D33N, D33S, E187Q ont été créés par T. Loisel (1992) lors de la préparation de sa maîtrise et les mutants K107M, K229M, K146M, K146A, S271A et E187A par D. Demoissac (1995) également lors de ses travaux de maîtrise. Ces mutants sont purifiés selon un protocole semblable à celui de l'aldolase native (Morris et al., 1993). Le plasmide pPB14 contient le gène de l'aldolase du muscle de lapin dans le vecteur pPB1 qui nous a été envoyé par le Dr D. R. Tolan (Université de Boston). pPB1 est un vecteur ATG qui contient le gène de résistance à l'ampicilline, le promoteur fort (*trc*), le site d'initiation de traduction de la β -galactosidase qui permet d'identifier les clones ayant la séquence de l'aldolase native et mutante. Ce vecteur contient un site de polyclonage de pKK233-2 avec l'origine de répllication de pUC19 (Beernink et Tolan., 1992). Cette origine permet l'augmentation du nombre de plasmides, soit environ 500 à 700 par cellule. Les sites de digestion correspondent aux enzymes de restriction EcoR1, Sal 1 et HindIII permettent de vérifier que l'insert de l'aldolase est présent dans le vecteur d'expression (Demoissac et al., 1995). L'utilisation des cellules (JM83, JM109 et DH5 α MCR) (Yannish-Perron et al., 1985 ; Hanahan., 1983) a montré que seules les souches DH5 α MCR aboutissent à une

expression satisfaisante de l'enzyme. Les plasmides pPB14 se composant du gène de l'aldolase native et muté sont donc transformés dans les cellules compétentes de *E. coli* DH5 α MCR. La transformation des plasmides, effectuée systématiquement avant chaque purification, permet l'amélioration du rendement des protéines purifiées. En plus, l'utilisation de colonies fraîchement transformées donne un rendement qui varie entre 15 à 50 mg de protéine par litre de culture bactérienne.

2.1.3 Purification de l'aldolase

La purification se déroule selon quatre étapes essentielles (Berthiaume., 1989). Elle commence par le broyage à l'aluminat des bactéries qui permet la lyse des cellules. L'étape suivante est l'élimination des protéines autres que l'aldolase du lysat par chromatographie échangeuse d'anions (DEAE-Sepharose). Ensuite vient l'étape qui, pour l'élution par affinité dans une colonne de chromatographie échangeuse de cations (CM-Sepharose), utilise le substrat (FBP). La dernière étape est l'élution qui, par la colonne de chromatographie par gel de filtration (FPLC), élimine par tamis les espèces de faible poids moléculaire encore présentes en solution. La protéine purifiée va ensuite être précipitée dans du sulfate d'ammonium saturé à 90% et gardée à 4°C.

La pureté des protéines et leur état oligomérique sont vérifiés respectivement par gel SDS-PAGE et par diffusion de la lumière en solution (DLS). D'un autre côté, les mutants de l'aldolase sont purifiés avec les mêmes procédés que l'enzyme native avec des ajustements du pH des solutions d'élution selon les types de mutation cités ci-dessous (Demoissac., 1995).

Dans le cas particulier de la mutation de la Lys ou Arg en Met, le pH nécessaire à l'élution de la colonne (CM-Sepharose) doit être plus bas que celui de l'aldolase native. Pour les mutants dont l'activité est très faible ou presque nulle, cas du mutant K229M, le substrat a été aussi utilisé dans l'élution de l'enzyme par la colonne d'affinité (CM-Sepharose)(Demoissac., 1995).

2.1.4 Méthode de dosage des protéines

Afin de doser la quantité d'enzyme obtenue en solution au cours et après purification, deux méthodes sont utilisées. La première méthode est le dosage au BCA (Pierce et Suelter., 1977), en précipitant l'enzyme dans l'acide trichloroacétique afin de diminuer l'effet du tampon et des molécules présentes en solution qui peuvent créer des interférences lors du dosage (Smith et al., 1985). La seconde est la méthode de dosage classique par mesure de densité optique à une longueur d'onde λ de 280 nm. Le coefficient d'extinction molaire de l'aldolase ϵ est égal à 0.91 unités, pour une concentration d'enzyme de 1mg/ml.

2.1.5 Analyse des protéines en solution

Cette analyse est effectuée grâce au système de diffusion de lumière en solution (DLS) (Protein solutions, Dyno Pro-801TC). La concentration et le volume de l'échantillon de protéine sont respectivement de 2 mg/ml et de 80 μ l. La mesure du rayon de giration des molécules en solution nous permet de connaître leur état oligomérique et la mono ou polydispersité de la solution protéique. Elle permet aussi de connaître l'effet de plusieurs facteurs dont le tampon, les solutions de cristallisation et certaines molécules (le substrat, les inhibiteurs et les ions sur la structure quaternaire de l'enzyme).

2.2 Étude cinétique de l'aldolase du muscle de lapin

2.2.1 Dosage de l'activité catalytique

La détermination de l'activité de l'aldolase se fait grâce au couplage avec deux autres enzymes, la triose phosphate déshydrogénase et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (TIM-GDH)(Figure 13).

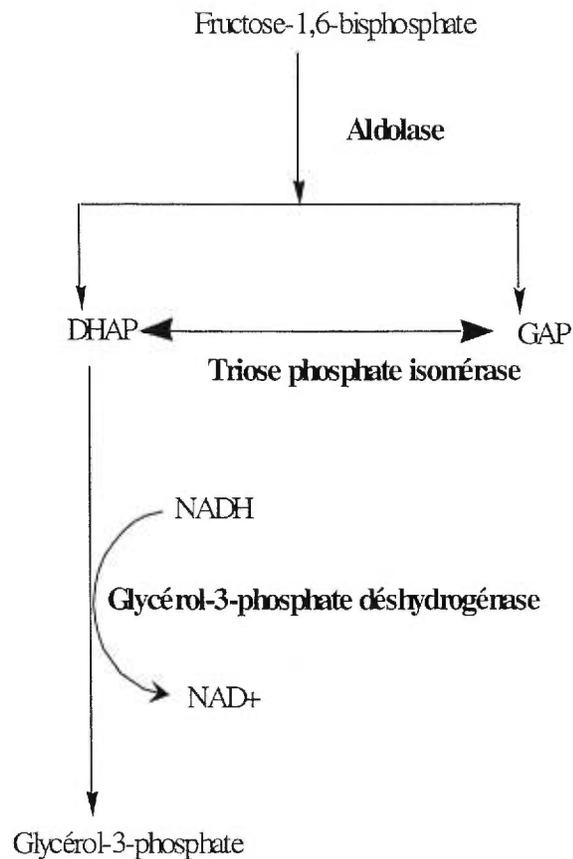


Figure 13 : Dosage enzymatique couplé de l'aldolase de classe I

L'activité catalytique est le nombre de molécules de substrat (FBP) transformées par l'aldolase en produit (DHAP et GAP), par unité de volume et de temps. L'oxydation du NADH est proportionnelle au nombre de molécule de FBP transformées par l'aldolase. Une molécule de FBP induit l'oxydation en NAD^+ de 2 molécules de NADH. Cette diminution d'absorbance de NADH est détectable par spectrophotométrie (Spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda II) à ultraviolet à une longueur d'onde λ de 340 nm. Les mesures expérimentales sont réalisées à la température de la pièce en utilisant différentes concentrations de substrat (FBP) de pH 5 à 10. Ceci dans le respect des conditions de

stabilité des enzymes de couplage utilisées (Mehler et al., 1963). Les quantités d'enzymes sont choisies de manière à ce que la différence de densité optique (DO) soit linéaire correspondant à un état stationnaire du système. C'est-à-dire qu'il y a un flux constant qui s'écoule du complexe enzyme-substrat vers le produit dont le taux s'accroît linéairement.

Les solutions de dosages utilisées sont constituées de 50mM de Tris-HCl au pH variant de 6 à 9, 0.3mM de β -NADH et 10 μ g de TIM et 10 μ g de GDH et une concentration variant de 10 μ M à 1 mM de FBP.

Afin de déterminer les facteurs cinétiques (A_s , V_{max} , K_m) de l'aldolase du muscle, nous avons mesuré l'activité catalytique à diverses concentrations du substrat (FBP) : 10, 20, 50, 100, 200 μ M et 1mM. La réaction est dosée à différents pH (5 à 10) du tampon Tris. La quantité d'aldolase, préalablement déterminée, est ajoutée au mélange réactionnel (volume final 1ml). L'activité spécifique A_s (Unités/mg), est représentée par :

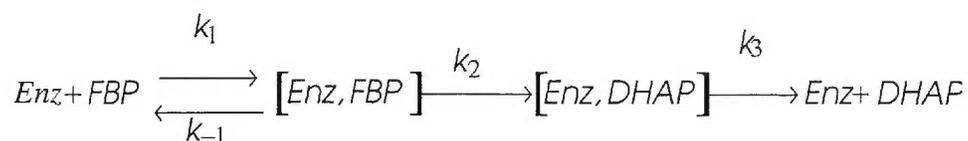
$$A_s = \frac{1000 \Delta DO_{340nm}}{2 \epsilon t m_p}$$

Avec, m_p la quantité de protéine exprimée en milligramme, ϵ le coefficient d'extinction molaire du NADH qui est égal à 6257 ($M^{-1}cm^{-1}$) et t le temps exprimé en minutes.

Le facteur 2 représente les deux molécules de NADH oxydées par une molécule de substrat FBP et ΔDO_{340nm} représente la variation de la densité optique mesurée à 340 nm.

2.2 Cinétique Enzymatique

La détermination de l'activité spécifique (A_s), de la vitesse maximale de la réaction enzymatique (V_{max}) et de la constante de Michaelis (K_m) est effectuée à partir des vitesses calculées de l'équation de Michaelis-Menten. La variation en fonction du pH de l'activité spécifique, de la constante de Michaelis K_m et du facteur k_{cat} / K_m ainsi que le calcul des pKa correspondant aux données expérimentales sont déterminés par le programme GRAFIT (Leatherborrow et al., 1992). La variation de ces paramètres en fonction du pH et d'un mutant à l'autre, nous renseigne sur la nature des réactions limitantes pour chacun des mutants étudiés. En effet, l'affinité du site actif pour le substrat est évaluée grâce au facteur K_m . Les valeurs de pKa déterminées à partir de la variation de l'activité spécifique A_s en fonction du pH vont nous renseigner sur le changement d'état ionique qui influence l'activité de l'enzyme. Ceux déterminés à partir du rapport k_{cat} / K_m vont déterminer les états ioniques du substrat ou de l'enzyme libre nécessaire à la formation du complexe enzyme-substrat. Le facteur k_{cat} est le nombre de molécule de substrat converti en produit par la quantité d'enzyme par unité de temps ($1/k_{cat}$ (s) est le temps nécessaire pour transformer une molécule de substrat par molécule d'enzyme). Le modèle de Michaelis-Menten qui décrit la réaction enzymatique :



avec $V_{max} = k_2 k_3 / (k_3 + k_2)$, $K_m = [k_3 / (k_3 + k_2)] \times [(k_2 + k_{-1}) / k_1]$,

$k_{cat} / K_m = k_2 k_{-1} / (k_2 + k_{-1})$ et $V_{max} / K_m = [Enz] \times k_2 k_{-1} / (k_{-1} + k_2)$. k_i est la constante d'équilibre de la réaction i (Rose et al., 1965).

2.3 Cinétique d'échanges isotopiques $^3\text{H}/^1\text{H}$ de l'aldolase du muscle de lapin

2.3.1 Méthodologie

Les solutions utilisées dans cette expérience sont le tampon TEA-HCl (50mM) à pH 7.0, la solution de protéine d'albumine de sérum de bovin BSA (1 mg/ml) utilisée pour des faibles quantités d'enzyme, 1 $\mu\text{mol/ml}$ de DHAP et x $\mu\text{g/ml}$ d'aldolase de muscle (x varie entre 0.4 et 0.8 μg pour l'aldolase native et varie aux alentours de 100 μg à 1mg pour les mutants) diluée dans le tampon TEA. La quantité d'enzyme pour chaque mutant est déterminée en tenant compte de celle nécessaire à la détermination de son activité catalytique. Avant de commencer l'expérience, nous avons laissé le mélange réactionnel s'équilibrer pendant 15min. Une quantité de neuf nmoles (9 nmol) de DTAP est ajoutée en dernier au mélange et le volume final est ajusté à 1 ml. Pour séparer le DTAP de l'eau tritiée (T_2O), nous utilisons 0.4 ml de résine (Dowex WX1, forme Cl^-) préalablement lavée à l'eau dans des colonnes de 15 ml (Biorad).

La concentration de l'aldolase est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280 nm. Par contre, la concentration du DHAP est dosée enzymatiquement grâce à la glycérine 3-phosphate déshydrogénase (GDH). Ce dosage est effectué en présence du NADH (0.3 mM) à 340 nm (notons que 0.15 mM de DHAP correspond à une différence de densité optique de 0.937).

Après avoir bien homogénéisé la solution, la réaction démarre lors de l'addition du DTAP au mélange réactionnel. L'avancement de la réaction est déterminé ci-dessous :

Nous ajoutons à des temps déterminés (5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 250,... minutes), un volume de 100 μl de la solution d'EtOH 100% qui est égal à celui du mélange réactionnel prélevé afin d'arrêter la réaction enzymatique. Nous ajoutons ensuite le double de ce volume (200 μl) de la solution EtOH/ H_2O . Les solutions sont gardées dans la glace puis passées à travers les colonnes de résine (Dowex WX1, forme Cl^-). La colonne est lavée 11 fois avec un volume de 200 μl de H_2O . L'éluat ainsi que les solutions de lavages contenant le T_2O sont récupérés dans la même fiole à scintillation. Nous récupérons ensuite

le DTAP fixé sur la colonne grâce à une solution de 2.4 ml de 0.1N d'acide chloridrique (HCl) écoulee à travers la colonne et qu'on récupère dans une fiole à part.

Une solution contenant le mélange réactionnel sans enzyme permet d'avoir une mesure initiale du nombre de coup par minute avant le commencement de la réaction d'échange isotopique. Pour déterminer le nombre de coup correspondant à la totalité du DTAP en solution, on effectue le comptage à partir d'une solution prélevée directement du mélange réactionnel d'un même volume que celui utilisé dans les précédents échantillons (100 µl) et auquel on ajoute 2.3 ml d'eau pour avoir un volume similaire au précédent échantillon. Nous effectuons le comptage du tritium après avoir ajouté 20 ml de liquide à scintillation aux fioles contenant le DTAP et à celles contenant l'eau tritiée. Le comptage du ^3H permet de mesurer le nombre de coups par minute (cpm) correspondant au tritium radioactif dans chacune des fioles à scintillation.

2.3.1 Exploitation des résultats de la cinétique d'échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$

La quantité de DTAP qui échange le tritium en position pro-S au temps t (min), est déterminée à partir de la variation du nombre de tritium $Q(\text{DTAP})$ que l'enzyme catalyse lors de la réaction. Ce terme est mesuré à partir du nombre de coups par minutes (cpm) de DTAP récolté .

La vitesse de la réaction d'échange isotopique peut être mesurée à partir de la variation de la quantité de l'eau tritié en solution au cours du temps. Le nombre de tritium libéré dans l'eau lors de cette réaction est A_t . Ce terme est calculé à partir du nombre de cpm de l'eau tritié récoltée $Q(\text{T}_2\text{O})_t$.

$$A_t = Q(\text{T}_2\text{O})_t / \text{cpmt} \quad (\mu\text{mol})$$

Avec A_t , le nombre de DTAP et d'eau tritié totale récolté dans chacun des intervalles de temps ;

A_m est la moyenne du nombre de cpm total A_t mesuré à différents temps de la réaction.

A'_t représente le facteur A_t corrigé par rapport la quantité totale de tritium échangé et s'écrit sous la forme :

$$A'_t = Q(T_2O)_t \times (A_m / A_t) \quad (\text{cpm})$$

Chez l'aldolase native, 96% représente le pourcentage de radioactivité réel de DTAP qui est impliqué dans la réaction d'échange $^3\text{H}/^1\text{H}$. Ce terme varie au cours du temps à cause de plusieurs facteurs (radiolyse, hydrolyse,...). L'utilisation de DTAP fraîchement synthétisé permet de mesurer la réaction d'échange en minimisant l'effet de ces facteurs. On tiendra compte de ce pourcentage dans la suite du calcul de la vitesse d'échange corrigée (section 3).

La vitesse d'échange v ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) est déterminée à partir de la variation au cours du temps de la quantité $Q(T_2O)_t$ corrigée :

$$v = d(Q(T_2O)_t) / dt$$

La vitesse v dépend de la quantité du DTAP détritiiée dans un volume de 1 ml du mélange réactionnel au cours du temps t .

La vitesse de réaction calculée permet de connaître l'implication du résidu muté dans l'étape d'échange du proton pro-S. Les mutants ciblés dans cette étude sont ceux qui affectent l'activité enzymatique et sont principalement les mutants E187Q, E187A, S271A, D33N, D33S, K146A, K146M, K107M, K146A et K229M ainsi que l'aldolase native. La Tyr-363 qui semble être impliquée dans l'échange de protons sur le carbone C_3 (Rose et

O'Connell., 1965), est éloignée par rapport au site actif, raison pour laquelle elle n'a pas été ciblée dans cette étude.

2.3.3 Intermédiaires de la réaction enzymatique

Afin de connaître l'efficacité catalytique de l'arrachement du proton pro-S de la base de Schiff qui conduit à la formation de l'énamine, il est nécessaire de mesurer le nombre réel de bases de Schiff formées entre le DHAP et l'aldolase. Ceci va nous permettre de connaître le ou les résidus impliqués dans cette étape.

La détermination de la concentration de la base de Schiff et du carbanion catalysés par l'aldolase en présence du DHAP est réalisée grâce au marquage isotopique du FBP et DHAP avec le ^{32}P (Sygusch et Beaudry, non publié). Le coefficient d'efficacité catalytique k_e de l'aldolase est calculé en tenant compte de la quantité réelle de base de Schiff formée à l'équilibre. La constante catalytique, k_T (s^{-1}) est la vitesse V_T de la réaction d'échange $^3\text{H}/^1\text{H}$ ($\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$) normalisée par la concentration d'enzyme.

L'efficacité catalytique k_e est déterminée à partir du pourcentage des intermédiaires covalents enzyme-substrat sous forme de base de Schiff Q_{BS} . En présence du DHAP marqué au ^{32}P , l'aldolase entraîne la formation des deux intermédiaires covalents du DHAP, base de Schiff et énamine dont le pourcentage à l'équilibre est déterminé par précipitation acide à l'aide de l'acide trichloroacétique (Sygusch et Beaudry, non publié).

L'efficacité catalytique k_e de l'enzyme s'écrit alors :

$$k_e = [k_T * 100] / Q_{BS} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

2.4 Étude cristallographique de l'aldolase du muscle de lapin native et mutante

2.4.1 Cristallisation de l'aldolase native et mutante

La cristallisation est une étape déterminante dans l'étude structurale des protéines. Elle a pour but d'obtenir des cristaux d'une taille suffisante (0.2 mm) qui diffractent à haute résolution. Ces cristaux sont l'outil de base de cette méthode. La cristallisation, nécessite l'obtention d'une quantité suffisante de protéines repliées, homogènes, dont la pureté est supérieure à 95%. La quantité de protéines purifiées nous permet de faire une large gamme d'essais de cristallisation.

Le passage de la solution protéique d'un état sous-saturé à un état sursaturé, d'une manière ordonnée, engendre deux phénomènes importants. Le premier est la nucléation, l'apparition des germes qui sont les noyaux qui vont former les cristaux. Le second est la croissance des germes suite à la diminution de la solubilité de la protéine qui aboutit à la formation de cristaux. La durée de ce processus peut varier selon la technique, les protéines et les conditions de cristallisation. Elle peut varier de quelques jours à quelques mois.

Les techniques de cristallisation utilisées dans le cas de l'aldolase du muscle et de ses mutants sont la cristallisation par "Batch" et par diffusion en phase vapeur, utilisant un large éventail de précipitants. L'aldolase "fraîchement" purifiée par colonne d'affinité, est ensuite débarrassée de toutes autres impuretés (agrégats, ligands) grâce à la colonne de chromatographie par tamis moléculaire puis précipitée dans 90% de sulfate d'ammonium. La protéine solubilisée dans le tampon de cristallisation est testée par mesures de diffusion de lumière en solution (DLS), ce qui permet de vérifier l'état oligomérique et la monodispersité de la protéine nécessaire au succès de la cristallisation.

La cristallogénèse de l'aldolase s'effectue en trois étapes. La première étape est la cristallisation de plusieurs mutants de l'aldolase et la détermination de leur structure tridimensionnelle. Parallèlement, des essais de cristallisation au laboratoire et en microgravité de l'aldolase ont été entamés afin de trouver de nouvelles formes cristallines. Cette approche est utilisée pour augmenter la résolution des nouvelles formes cristallines tout en améliorant leur qualité (stabilité, résistance à la dégradation par les rayons X).

L'étape finale est la détermination des conditions optimales de cristallisation des complexes de l'aldolase avec certains inhibiteurs. L'obtention de nouvelles formes cristallines de l'aldolase permettra la détermination des structures des complexes de l'aldolase avec certains inhibiteurs.

2.4.2 Méthode de cristallisation par "Batch"

La cristallisation des mutants de l'aldolase est effectuée par la méthode "Batch" utilisée ultérieurement dans le cas de l'aldolase native (Sygusch et al., 1987). Les modifications apportées au protocole, ont permis d'améliorer la qualité des cristaux. Ces derniers sont plus stables et leur croissance se fait désormais dans une solution protéique non précipitée.

La méthode de la cristallisation nommée "Batch" nécessite une importante quantité d'enzymes (1mg par expérience de cristallisation) et consiste à mélanger l'agent précipitant et la solution protéique dans des conditions d'équilibre. Ces conditions permettent à la fois la nucléation et la croissance des cristaux. Le mélange formé par la solution protéique et l'agent précipitant permet aux noyaux formés de croître (Figure 14). Les cristaux de l'aldolase en forme de plaquettes sont obtenus selon le protocole de cristallisation décrit ci-dessous :

La protéine stockée précipitée dans 90% de sulfate d'ammonium, est solubilisée dans la solution de cristallisation : TEA 100mM pH 7.4, EDTA 5mM, sulfate d'ammonium 38%. Elle est ensuite dialysée dans cette même solution à 40 % de sulfate d'ammonium

pendant 30 min afin d'atteindre les conditions d'équilibre. La durée de dialyse est très importante et doit s'effectuer en évitant de précipiter la protéine. La solution protéique est ensuite centrifugée pour se débarrasser du précipité (agrégats amorphes). La concentration de protéine est déterminée spectrophotométriquement par la mesure de la densité optique à 280 nm. La concentration d'enzyme ajustée à 5.5 mg/ml avec la solution de 40 % de sulfate d'ammonium. La solution résultante est ensuite utilisée pour effectuer la cristallisation selon les étapes suivantes :

- 1 On divise la solution protéique en plusieurs fractions de 200 μ l dans des tubes en verre. On ajoute ensuite graduellement de la solution de 100% de sulfate d'ammonium à chaque fraction pour atteindre une concentration où la solution commence à précipiter.
- 2 Ces concentrations varient de 42 à 44% de sulfate d'ammonium et correspondent à l'apparition d'un précipité nuageux. Ce précipité formé par des noyaux et des agrégats amorphes se dissout progressivement en ajoutant par fraction de 2 μ l le tampon TEA (100 mM), jusqu'à dissolution totale du précipité.
- 3 Les agrégats amorphes se dissolvent plus rapidement que les noyaux cristallins, en général un volume de 6 μ l de TEA (100 mM) est suffisante pour dissoudre le précipité.
- 4 Ensuite nous déposons un volume de 1 μ l de sulfate d'ammonium 100% au fond du tube pour générer des noyaux. Ces tubes sont ensuite scellés avec du parafilm et gardés dans une étuve thermostatée à la température de 29°C (Figure 15).

Ces conditions de cristallisation se situent dans la zone métastable et induisent la formation de cristaux de taille importante. Afin d'améliorer leur taille ainsi que leur forme en plaquettes, différents additifs ont été utilisés et principalement l'isopropanol (2%) et le glycérol (1-2%). Le premier précipite la protéine et le second n'a pas d'effet sur les conditions de cristallisation mais est utilisé par la suite comme cryo-protectant.

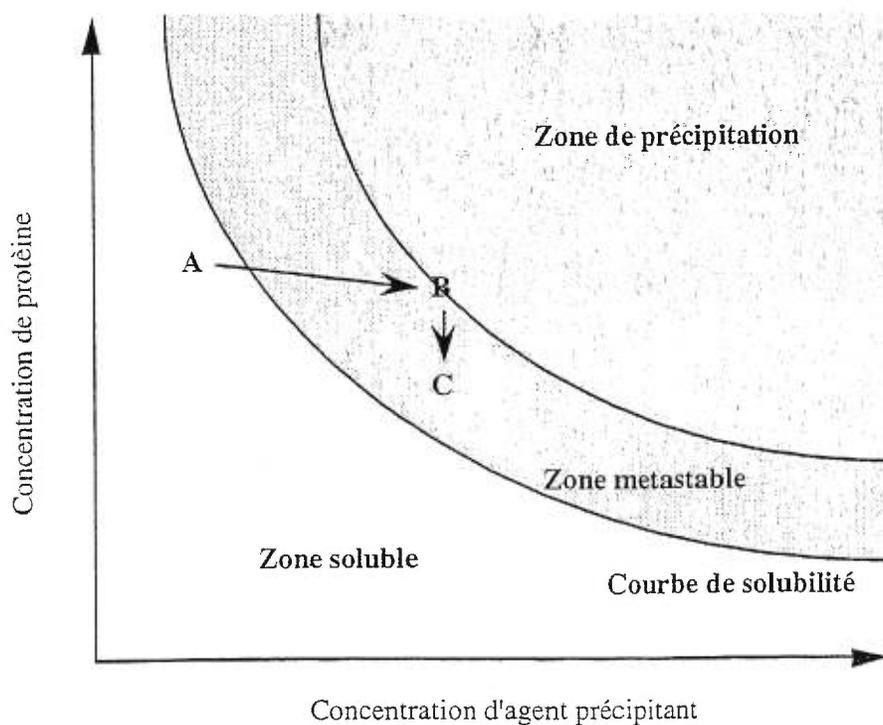


Figure 14 : Diagramme de solubilité indiquant les étapes de la cristallisation par la méthode "Batch"

Avec A, B, et C correspondent aux étapes de cristallisation décrites précédemment dans la méthode "Batch".

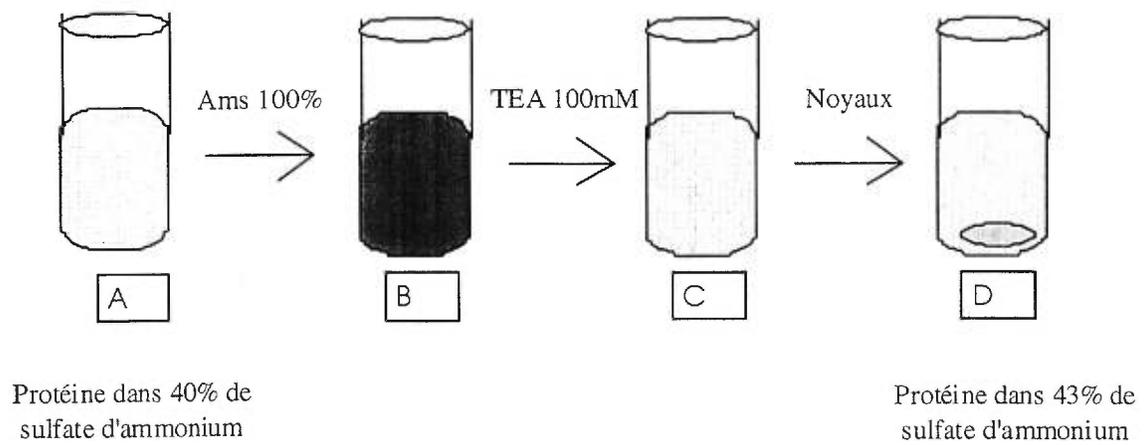


Figure 15 : Les étapes de cristallisation par "Batch" de l'aldolase du muscle de lapin native et de certains de ses mutants.

2.4.3 Cristallisation en microgravité

Les études précédentes ont montré que dans le cas de certaines protéines, la microgravité pouvait améliorer la qualité des cristaux (DeLucas et al., 1989). L'aldolase a été étudiée par cristallisation en microgravité lors de plusieurs missions de la navette spatiale (STS-86, STS-89). La technique utilisée vise à comparer et à évaluer la qualité des cristaux terrestres et ceux en microgravité par la diffraction aux rayons X. Ces cristaux seront caractérisés en fonction de leur taille, de leur pouvoir de diffraction, de leur limite de résolution ainsi que de leur mosaïcité. L'approche utilisée dans la cristallisation dans l'espace est la diffusion entre deux solutions (diffusion liquide-liquide), la solution de protéine et la solution d'agent précipitant.

2.4.3.1 Principe et technique

Cette technique vise à cristalliser des protéines dans l'espace afin d'améliorer leur résolution et particulièrement celle des nouvelles formes cristallines de l'aldolase du muscle. Nous avons utilisé les blocs DMDA "Double diffusion method" dont le "design" est effectué à ITA (Instrumental Technology Associates). Ce système permet la cristallisation avec la technique de diffusion en solution grâce au contact de la solution protéique soit avec une solution d'agent précipitant (TM) ou avec deux solutions (SP). Elle permet aussi la cristallisation par diffusion vapeur (OD) (DMDA communications, 1994).

Pour atteindre l'équilibre, nous avons utilisé des concentrations de protéines et d'agents précipitants proches de celles des nouvelles formes cristallines terrestres obtenues par diffusion vapeur et diffractant à faible résolution. Il est donc intéressant d'entamer les tests de cristallisation en microgravité avec une technique similaire à celle de la méthode "Batch", la diffusion liquide-liquide par interface (TM) en utilisant les Blocs DMDA (Figure 16).

2.4.3.2 Cristallisation en microgravité à 4°C

Parmi les trois méthodes de cristallisation citées ci-dessus, la technique (SP) est celle qui a donné des cristaux en microgravité. Afin de comparer l'effet de la microgravité sur la qualité de la forme cristalline, des essais de cristallisation par batch à 4°C, utilisant ces mêmes conditions, ont été réalisées et s'avèrent, contrairement à la diffusion vapeur, plus proches de celles utilisées dans l'espace. Dès leur retour de l'espace, les cristaux sont immédiatement examinés, photographiés, puis analysés par diffraction aux rayons X.

2.4.3.3 Cristallisation en microgravité à 22 °C

Lors de la mission spatiale STS-89, les essais de cristallisation se font uniquement à 22 °C et l'effet de la microgravité n'a pu être testé qu'à cette température. La condition d'agent précipitant utilisée est similaire à celle des cristaux obtenus sur terre et qui correspond à 43% de sulfate d'ammonium, de TEA (100mM) à pH 7.4 et d'EDTA (5mM).

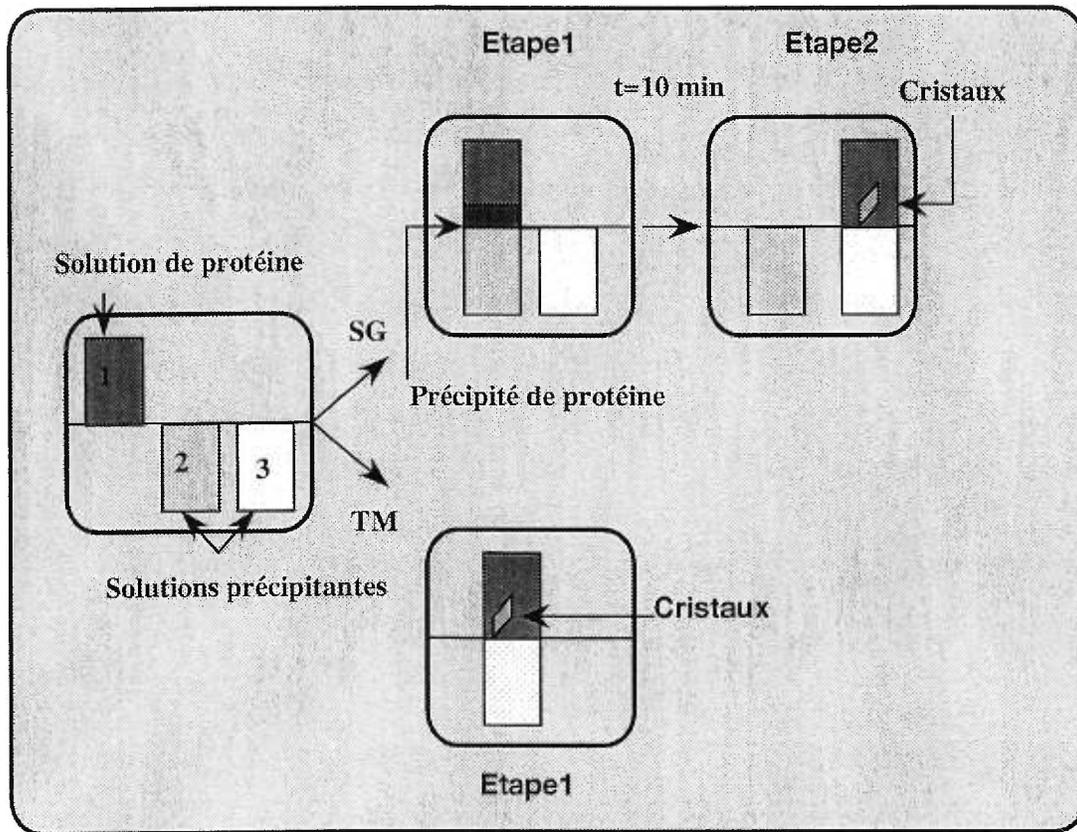


Figure 16 : Technique de cristallisation en microgravité avec le dispositif "DMDA".

2.4.4 Manipulation des cristaux

Les cristaux d'aldolase, ne sont pas utilisables en entier pour la diffraction aux rayons X. Ils contiennent deux parties, dont l'une donne une couleur noire à la lumière du polarisateur. Ils ont aussi la caractéristique d'être formés par une juxtaposition de plusieurs autres petits cristaux en formes de plaquettes. De ce fait, ces cristaux sont taillés de manière à utiliser uniquement les parties claires et les macles sont enlevées (Figure 17). Ceci nous permet d'obtenir un monocristal utilisable pour la diffraction aux rayons X. La maille du cristal est monoclinique de côtés a , b et c et d'angles α , β et γ . Cette forme cristalline est montée dans le capillaire de manière à avoir l'axe b parallèle au faisceau de rayons X. Cette configuration permet, grâce à une rotation du cristal de 180° , de collecter des données complètes de diffraction aux rayons X.

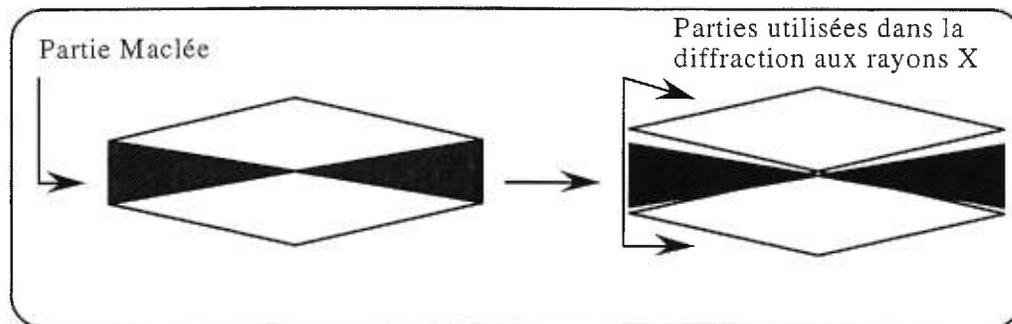


Figure 17 : Procédure d'extraction des macles des cristaux d'aldolase du muscle de lapin

2.4.5 Montage des cristaux

Les cristaux d'aldolase taillés précédemment, sont ensuite lavés dans une solution mère, sans protéine et équivalente à celle de la cristallisation (43% de sulfate d'ammonium). Ce lavage permet d'éviter la formation d'un film qui enveloppe le cristal monté et qui n'est autre que la protéine précipitée. Le montage des cristaux est ensuite effectué dans des capillaires en quartz dont le diamètre varie de 0.7 à 1.5 mm dépendant de la taille du cristal.

2.4.6 Nouvelles formes cristallines de l'aldolase

La forme cristalline obtenue précédemment ne permet ni la co-cristallisation ni le "soaking" de l'aldolase avec certains ligands (le substrat FBP et inhibiteurs). Il a été donc nécessaire de trouver d'autres formes cristallines avec les caractéristiques suivantes : L'aldolase est sous une autre forme oligomérique et de préférence dimérique ou monomérique. Cette forme doit être active et doit permettre la diffusion des inhibiteurs et du substrat dans le site actif sans affecter la stabilité des cristaux. Pour cela, nous avons utilisé la technique de la diffusion en phase vapeur. La technique de la goutte pendante nous a permis d'utiliser de faibles quantités de protéines, le volume des gouttes variant entre 2 à 20 μ l, sur une large gamme de conditions de cristallisation décrites dans "Crystal reagent components screen I, II" de la compagnie "Hampton Research".

2.5 Détermination et affinement des structures tridimensionnelles des mutants cristallisés de l'aldolase du muscle de lapin

2.5.1 Introduction

Pour compléter la partie cinétique, il est nécessaire de déterminer et d'analyser la structure des mutants obtenus. Cette méthode qui connaît un grand succès a été développée afin de comprendre le rôle des résidus impliqués dans la fonction des enzymes. Elle consiste à muter ces résidus et à étudier l'effet de cette mutation aussi bien sur l'activité de l'enzyme que sur sa structure. Les cristaux des mutants K229M, E187A,

E187Q et K107M de l'aldolase étudiés par diffraction aux rayons X, possèdent une maille monoclinique de groupe d'espace ($P2_1$) dont les paramètres de maille sont proches de celle de la native.

Dans ce qui suit, nous allons décrire les différentes étapes d'affinement des structures cristallographiques de ces mutants. Les coordonnées de la native sont utilisées comme modèle initial étant donné que les mutants sont isomorphes à la native. Le modèle, ainsi obtenu pour chaque mutant, est ensuite soumis à plusieurs cycles itératifs d'affinement et de modélisation. La modélisation fait appel au programme O (Cowan & Kjeldgaard., 1991) qui permet de corriger la conformation de plusieurs résidus en essayant de mieux les placer dans la densité électronique tout en respectant les contraintes interatomiques. L'affinement cristallographique se fait par le programme X-PLOR (Brünger et al, 1992) et procède suivant deux méthodes essentielles :

- a - L'affinement des positions des atomes tient compte du facteur d'agitation thermique total, anisotropique ainsi que le gradient conjugué des positions atomiques ;
- b - La dynamique moléculaire procède selon le protocole "Slow-cool" par recuit simulé.

2.5.2 Calcul de la carte de densité électronique

Au cours de la modélisation, les corrections effectuées sur la conformation des acides aminés prennent en considération plusieurs critères. Les angles de torsions (ϕ, ψ) des chaînes latérales doivent être proches de ceux déterminés préalablement dans la base des données tout en respectant les conformations permises par le diagramme de Ramachandran. La carte de densité électronique est calculée à partir de $(2F_o - F_c)$ ou F_o est le facteur de structure calculé et F_c est le facteur de structure observé. La carte de différence décrite par le facteur $(F_o - F_c)$ correspond à tous les changements de position des atomes lors du réarrangement structural dû à la mutation.

2.5.3 Facteur d'agitation thermique

L'analyse du facteur d'agitation thermique B des atomes des 363 résidus de l'aldolase nous renseigne sur les régions ayant une grande flexibilité conformationnelle. Ces régions situées entre les résidus 40 et 50 forment une hélice en interaction avec le site actif et les résidus de la partie C-terminale. Ces résidus ont un facteur d'agitation thermique B supérieur à 40 \AA^2 et une densité électronique difficilement interprétable lors des premiers cycles d'affinement.

2.5.4 Carte d'exclusion "Omit map"

Cette carte permet de confirmer la présence des résidus ou des molécules dans la densité électronique qu'on leur a attribuée à la fin de l'affinement. Dans notre cas, nous l'avons utilisé pour mettre en évidence la présence des changements conformationnels dans le site actif après mutation. Avant de commencer cette étape, il faut s'assurer que les résidus sont placés convenablement dans la densité électronique et qu'ils respectent tous les liens chimiques nécessaires à leur position (Bhat et Cohen., 1984).

2.5.5 Fusion des données de diffraction

Les données de diffraction par rayons X provenant de deux cristaux obtenus d'une même protéine sont généralement réunis en un seul ensemble de données. Afin de le réaliser, nous procédons d'abord à une mise à l'échelle entre les deux ensembles tout en évitant leur recouvrement "overlaps", puis nous déterminons le facteur d'échelle entre eux. Ce facteur est ensuite appliqué aux intensités de chacun des ensembles afin de déterminer le minimum par moindre carré qui nous confirme la faisabilité ou non du fusionnement des deux ensembles de données (Brünger et al., 1992).

2.5.6 Minimisation de l'énergie par X-PLOR

L'énergie E_T décrite par X-PLOR est groupée en deux différents termes (E_{EMP} , E_{EFFECT}). Le premier terme E_{EMP} décrit l'énergie de la molécule à travers une fonction

d'énergie empirique et le second E_{EFFECT} correspond à l'énergie restreinte qui fait appel aux données expérimentales. Le calcul du facteur de pondération ω_a entre l'énergie (E_{xref}) qui provient des données cristallographiques collectées et l'énergie qui correspond aux interactions atomiques (E_{EMP}) obtenues grâce à un bref calcul de la dynamique moléculaire permet le calcul de l'énergie E_{EFFECT} .

2.5.7 Minimisation par "Corps-Rigide"

Cette étape (première étape de l'affinement), vise à affiner la position d'un groupe d'atomes en minimisant ses 6 degrés de liberté : (3 angles de rotation d'Euler et 3 coordonnées x, y, z de translation) par rapport aux groupes d'atomes considérés comme une entité rigide en utilisant le programme X-PLOR

2.5.8 Affinement par "recuit simulé"

Lors de l'affinement par recuit simulé, on applique le protocole de "Slow-Cool". Il est utilisé dans le but d'apporter des corrections importantes sur la conformation de la chaîne principale des acides aminés lors des premières étapes de l'affinement. La température du modèle cristallographique est portée à 3000°K, puis elle est diminuée par pas de 250°K jusqu'à la température finale 300°K. On procède ensuite à 200 itérations de minimisation d'énergie suivies d'un affinement du facteur d'agitation thermique B. En général après le Slow-cool, les molécules d'eau subissent un important déplacement par rapport à la densité électronique qui leur correspond. Grâce au programme O, celles-ci sont replacées dans leur densité. La structure globale de l'enzyme est ensuite affinée (Brünger et al., 1989).

2.6 Méthodologie de la détermination de la structure de l'aldolase du muscle mutante

2.6.1 Affinement cristallographique

Étant donné que les cristaux des 4 mutants étudiés sont isomorphes à celui de la native, nous allons utiliser la stratégie décrite ci-après pour la détermination de leur structure. Pour les étapes d'affinement, un facteur R_{free} est calculé sur 8% des données cristallographiques choisies aléatoirement. La valeur initiale de ce dernier pour les quatre mutants est inférieure à 40%; ce qui nous permet de commencer directement par un affinement par corps rigide pour calculer les phases initiales des modèles sans utiliser la méthode de remplacement moléculaire. Les étapes de détermination de structures mutantes par cristallographie sont résumées ci-dessous.

Le modèle initial utilisé est celui de la native sans les molécules d'eau, le DHAP, les ions sulfate ni la partie C-terminale (résidus 343 à 363). Les phases de ce modèle préliminaire et les facteurs de structure du mutant sont utilisés lors de l'affinement par corps rigide. Ce modèle initial est ensuite affiné selon le protocole décrit précédemment.

2.6.2 Modélisation des mutants de l'aldolase

Le modèle atomique des mutants a été bâti avec le programme O en utilisant les cartes de densité électronique ($2F_o - F_c$) et de différence ($F_o - F_c$) calculées par le programme X-PLOR. Le programme OOPS (Kleywegt, non publié, 1996) a été conçu de telle façon que les résidus dont la conformation est incorrecte (angles, chiralité, distances) soient mis en évidence, ce qui donne une critique de la qualité du modèle. La majorité des corrections est située au niveau de la partie C-terminale et les hélices 30-40 et 310-320 dont les résidus forment le passage menant au site actif. Les derniers cycles de l'affinement sont focalisés sur la région C-terminale et sur le site actif. La densité électronique dans le site est interprétée de façon à confirmer la présence ou non de ligand (FBP, DHAP, GAP).

2.6.3 Molécules d'eau

Les molécules d'eau sont très importantes dans le modèle cristallographique. Elles interagissent entre elles et avec la protéine et contribuent aussi bien à la stabilité qu'au mécanisme catalytique des enzymes. Les molécules d'eau complètent le modèle et permettent l'amélioration des phases calculées. Elles sont localisées pour des pics de densité électronique ($2F_o - F_c$) compris entre 2.4 à 3 sigma à une distance inférieure à 4 Å des acides aminés. Lors de l'affinement, uniquement les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique B est inférieur à 40 Å² et dont la densité électronique est sphérique et supérieure à 2.8 sigma sont gardées, les autres sont enlevées du modèle. Les molécules d'eau sont ajoutées graduellement et leur nombre dépend de plusieurs paramètres dont principalement la résolution du cristal et la taille de la protéine (Blom et Sygusch., 1997).

L'affinement par "Slow-cool" engendre un important déplacement des molécules d'eau. Celles-ci sont replacées dans la densité électronique correspondante par modélisation puis leur position est affinée.

Le déroulement de l'affinement cristallographique est suivi grâce à deux facteurs : le R_{fact} calculé sur l'ensemble des données cristallographiques et le R_{free} calculé sur un nombre aléatoire représentant 10% du nombre des réflexions totales. La convergence de ces deux facteurs nous renseigne sur l'amélioration de la qualité du modèle au cours de l'affinement (Brünger et al., 1987).

2.6.4 Qualité du modèle cristallographique

La qualité du modèle est définie par une densité électronique parfaitement interprétable, une faible valeur de ($R_{\text{free}}, R_{\text{fact}}$) et par un pourcentage supérieur à 85% de résidus ayant une conformation dans les régions permises du Diagramme de Ramachandran. Le programme PROCHEK (Laskowski et al., 1993) est utilisé pour évaluer la qualité du modèle cristallographique.

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 L'expression et la purification de l'aldolase du muscle de lapin native et mutante

Les enzymes purifiées pour les études cinétiques, la cristallogénèse et la cristallographie aux rayons X sont les suivantes : l'aldolase native et les mutants K229M, K107M, K146M, K146A, D33N, D33S, E187Q, E187A, R258M et S271A. Ces enzymes sont purifiées avec un rendement moyen de 15 à 50 mg par litre de culture de *E. coli*. La vérification de la surexpression de l'aldolase et le suivi de la purification sont effectués par gel SDS-PAGE (Figure 18), par la courbe correspondant à la colonne de Gel filtration (Figure 19) et par des tests d'activité enzymatiques.

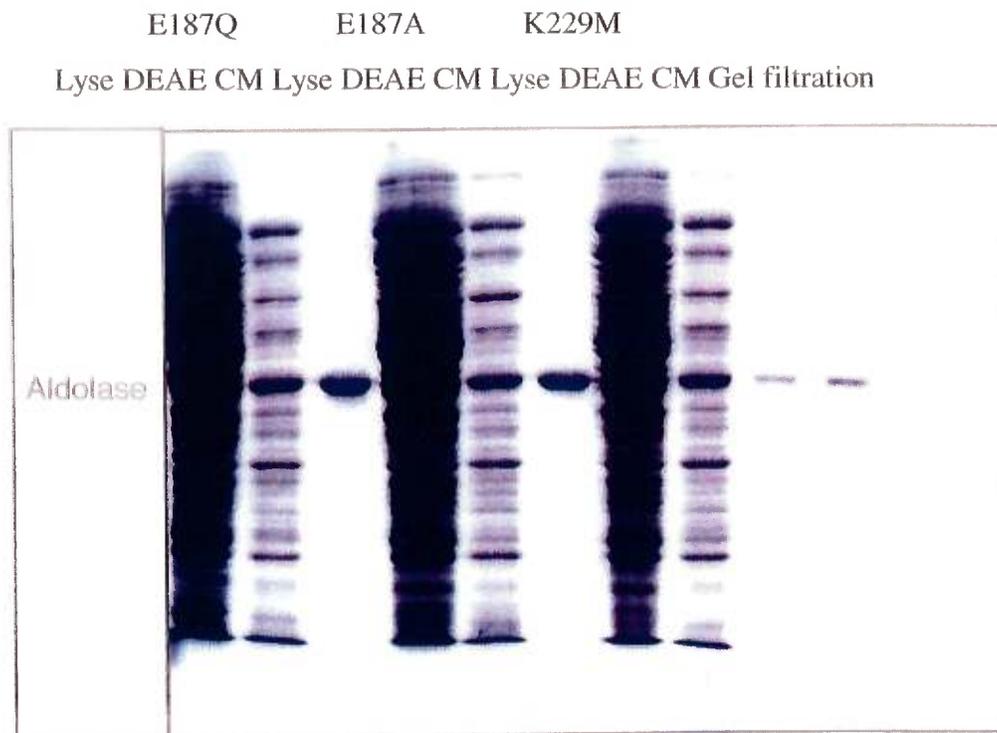


Figure 18 : Gel SDS-PAGE de certains mutants E187Q, E187A et K229M de l'aldolase du muscle de lapin lors des quatre étapes de purification (Lyse, DEAE, CM et Gel filtration).

3.2 Étude cinétique de l'aldolase native et mutante

La détermination de l'activité spécifique (A_s) de l'aldolase native et des mutants purifiés est effectuée dans les conditions citées précédemment. L'activité spécifique de mesure pour chaque mutant est présentée dans le tableau III. Ces résultats cinétiques sont en accord avec ceux obtenus lors d'études antérieures (Blonski et al., 1997; Morris et al, 1993). La seule activité qui diffère de celles obtenues dans la littérature est celle du K229M pour qui on a obtenu une activité 10^6 fois plus faible que celle de l'aldolase native.

Pour compléter les études cinétiques des mutants des résidus du site actif (Asp-33, Glu-187, Lys-146 et Lys-107) effectuées dans notre laboratoire par D. Demoissac, nous avons étudié la variation de l'activité enzymatique en fonction du pH des mutants K229M, R258M et E187Q situés également dans le site actif de l'aldolase.

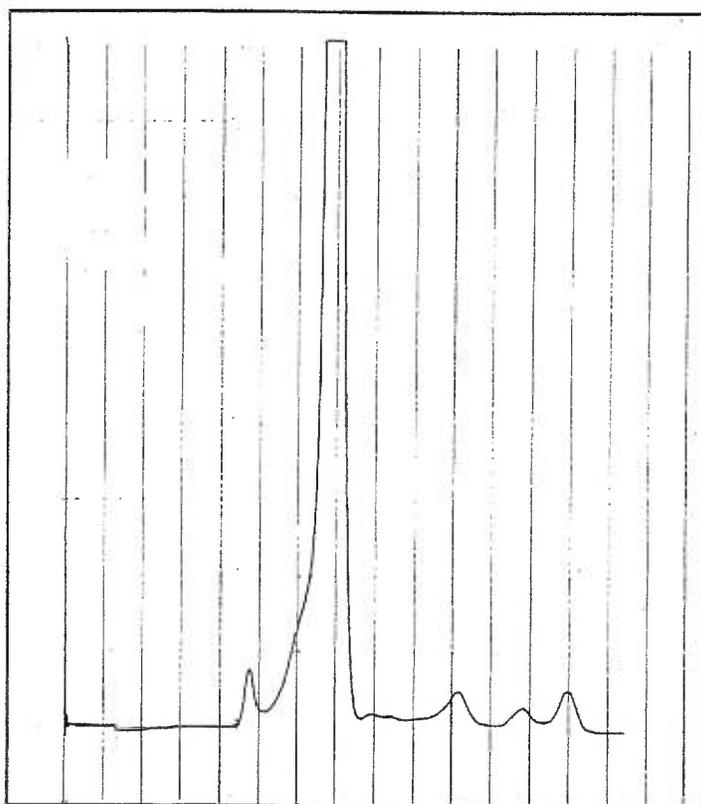


Figure 19 : Courbe d'élution de l'aldolase mutante par gel filtration (Superdex)

3.2.1 Étude cinétique de l'aldolase native

Entre le pH 6.5 et 9, l'aldolase du muscle de lapin native possède une activité stable de l'ordre de 12 unités/mg et une affinité (K_m) pour son substrat le FBP de 5 μ M. Au-delà de ces limites de pH, l'activité spécifique diminue drastiquement et l'affinité pour son substrat le FBP devient très faible (Figure 20). La variation de l'activité spécifique en fonction du pH montre que les états intermédiaires (carbinolamine, immonium et énamine) sont affectés par la variation du pH.

Les valeurs de pKa calculées à partir de l'activité spécifique à différents pH de l'aldolase native montrent une première valeur aux alentours de cinq unités. Cette valeur de 5.09 correspond à celle d'un résidu acide soit l'Asp-33 ou le Glu-187. Ces deux résidus sont les seuls résidus acides du site actif qui d'après la structure 3D de l'aldolase du muscle et de foie de lapin interagissent avec le FBP et le DHAP. La valeur de 5.09 ne correspond à aucune des valeurs de pKa du FBP. Effectivement, le FBP possède un pKa central de 5.88 qui correspond au passage d'un état mono-chargé à un état bi-chargé (Mehler et al., 1963). D'après la structure 3D de l'aldolase du muscle de lapin, seule la forme mono-anionique du substrat DHAP se lie au site actif (Blom et Sygusch, 1997).

La deuxième valeur de 10.36 peut être attribuée à deux candidats. Le premier correspond à l'intermédiaire base de Schiff du complexe aldolase-FBP qui, à partir du pH 10, garde difficilement l'état chargé de son groupement ϵ -ammonium. La charge de ce groupement permet à la réaction du clivage de la liaison entre le carbone trois et quatre du FBP d'avoir lieu. La neutralisation de cette charge élimine donc l'étape du clivage du substrat FBP et diminue ainsi l'activité de l'enzyme. Le second candidat est une lysine du site actif (notons qu'il n'y a pas de tyrosine dans le site actif). Le pKa d'une lysine est normalement de 10.79 (Voet and Voet, 1990). Le pKa de la lysine 229 qui, vu qu'elle effectue l'attaque nucléophile sur le substrat, et forme les intermédiaires réactionnels covalents avec le substrat ne peut correspondre à la valeur 10.36. C'est donc l'une des deux autres lysines du site actif qui sont la Lys-146 et la Lys-107 qui restent à analyser. La lysine 146, située proche de la

Lys-229 et du Glu-87, possède des interactions avec le groupement phosphate du carbone C₆ du FBP chez l'aldolase du foie de lapin. Sa proximité du Glu-187 suggère que cette lysine participe probablement à la réaction de clivage du FBP (Blom., non publié). Or le pKa de cette lysine est aux alentours de 8.5 (Hartman et al., 1976), et permet difficilement l'implication de cette lysine dans cette étape et principalement aux pH inférieurs à cette valeur. Quant à la Lys-107, elle est beaucoup plus impliquée dans la liaison du substrat que dans l'activité catalytique de l'enzyme (Demoissac., 1995). En effet, cette lysine stabilise le groupement phosphate du carbone 6 du FBP (Anai et al., 1973, Blom, non publié). Le pKa de 10.36 déterminé à partir de la variation de l'activité spécifique en fonction du pH, peut correspondre à celui de l'intermédiaire base de Schiff du substrat FBP.

3.2.2 Étude cinétique du mutant K229M

La lysine 229 est responsable de l'attaque nucléophile sur le carbone 2 du FBP aussi bien lors de la réaction du clivage du FBP que lors de la réaction inverse de condensation du DHAP et du GAP pour former le substrat FBP (Lai et al., 1974). L'activité spécifique du mutant K229M est égale à 3×10^{-6} unités/mg. Cette valeur en comparaison avec celle des autres mutants et principalement des mutants des deux autres lysines du site actif (Lys-107 et Lys-146) est beaucoup plus faible (Tableau III). Cette importante diminution de l'activité du mutant K229M confirme l'implication de la Lys-229 dans la formation de la base de Schiff avec le substrat FBP (Tableau III). La mesure de l'activité de ce mutant a nécessité une quantité importante de protéines, comparé à celle de l'aldolase native (2.5 mg d'enzyme au lieu de 0.7 µg). L'activité de K229M qui correspond à la variation de densité optique à 340 nm est à la limite des valeurs détectables par le spectrophotomètre. Ces deux causes ne nous permettent pas de mesurer le profil de pH nécessaire à la détermination de l'activité spécifique et de l'affinité (K_m) du mutant K229M pour son substrat le FBP.

Le facteur k_{cat}/K_m dépend de trois constantes catalytiques, k_2 , k_{-1} et k_1 décrites dans la section 2.2. Les valeurs de pKa, calculées à partir de la variation du facteur k_{cat}/K_m (7.09 et 9.02), montrent deux changements d'états d'ionisation qui affectent trois étapes du mécanisme catalytique (Tableau VI). Ces étapes sont la réaction de formation du complexe

aldolase-FBP, la libération du substrat FBP et l'expulsion du GAP. Connaissant les pKa du FBP libre en solution (2, 5.88, 13.2) déterminée expérimentalement, les pKa calculés à partir de la variation du facteur k_{cat}/K_m en fonction du pH, correspondent uniquement à ceux de l'enzyme et non pas à ceux du substrat FBP libre. Ces changements d'états d'ionisations déterminés à partir du facteur k_{cat}/K_m peuvent correspondre à celui de l'intermédiaire réactionnel base de Schiff ou aux résidus basiques du site actif. Les deux lysines du site actif sont mises en évidence par l'analyse suivante :

Le premier pKa (7.09) peut être attribué à une lysine du site actif qui lorsqu'elle devient neutre favorise l'expulsion du GAP. Cependant, elle peut aussi en devenant neutre stabiliser moins le groupement phosphate et donc favoriser la dissociation du FBP. Cette lysine est probablement la Lys-107 dont le pKa déterminé chez l'aldolase native est de 7.2 (Blonski. Non publié).

Le deuxième pKa (9.02) peut être attribué à une lysine du site actif qui, à l'état chargé contribuerait plus à l'association du substrat FBP qu'à sa dissociation et à l'expulsion du GAP. C'est probablement la Lys-146 qui à l'état chargé, faciliterait l'interaction avec le groupement phosphate P6 du substrat FBP. Le pKa de 9.02 est d'ailleurs proche de celui déterminé dans la littérature et qui est de 8.5 (Hartman., 1976).

L'Arg-148 situé dans le site actif et la Tyr-363 dans la partie C-terminale peuvent influencer également la variation de l'activité enzymatique, du K_m et du facteur k_{cat}/K_m de l'aldolase en fonction du pH mais leur rôle reste encore non clairement définis.

Protéine	Activité spécifique (unités/mg)	Quantité d'enzyme (μg)	Pourcentage d'activité résiduelle (%)
Native	11 ± 0.2	2	100
S271A	$0.007 \pm 1 * 10^{-4}$	113	0.063
K146M	$0.002 \pm 1 * 10^{-4}$	500	0.018
K146A	$0.004 \pm 1 * 10^{-4}$	170	0.036
K229M	$3 * 10^{-6} \pm 1 * 10^{-6}$	2500	-
K107M	0.7 ± 0.01	30	6.364
E187Q	$0.007 \pm 1 * 10^{-4}$	130	0.063
E187A	$0.04 \pm 1 * 10^{-4}$	120	0.36
E187D	$0.079 \pm 1 * 10^{-4}$	60	0.49
D33N	$0.003 \pm 1 * 10^{-4}$	400	0.027
D33S	$0.002 \pm 1 * 10^{-4}$	450	0.018
R258M	4.02 ± 0.1	10	36.54

Tableau III : Activité spécifique de l'aldolase du muscle native et mutante à pH 7.0.

Les profils de pH de l'aldolase native et des mutants D33S, D33N, K107M, K146A, K146M, E187A, E187D ont été déterminés par Demoissac en 1995.

3.2.3 Étude cinétique du mutant R258M

L'analyse de la structure tridimensionnelle de l'aldolase native nous a permis de mettre en évidence l'interaction entre la Tyr-363 des sous-unités 3 et 4 et l'Arg-258 des sous-unités 1 et 2 (Blom et al., 1997). Via cette interaction, l'Arg-258 joue probablement un rôle dans la stabilisation de la partie C-terminale dans la conformation de la structure de l'aldolase native. Cette arginine est probablement l'un des facteurs qui module la conformation de la partie C-terminale qui est étroitement reliée à sa spécificité par rapport

aux substrats (FBP, F1P). En effet, les études protéolytiques effectuées sur l'aldolase du muscle de lapin, montrent l'implication de la Tyr-363 dans l'activité et la spécificité par rapport au substrat (Berthiaume et al., 1993). Il est donc intéressant de connaître le rôle de l'Arg-258, résidu avec lequel la Tyr-363 interagit.

L'étude de l'activité spécifique du mutant R258M en fonction du pH est résumée dans le tableau IV. Les résultats obtenus montrent que contrairement aux autres mutants, la mutation de l'Arg-258 en méthionine compromet le moins l'activité de l'enzyme. L'activité du mutant R258M est trois fois moindre que celle de l'aldolase native. Ceci implique que l'interaction ionique entre l'Arg-258 et la Tyr-363 n'a pas un important impact sur la réaction enzymatique catalysée par l'aldolase sur son substrat, le FBP.

pH	Activité spécifique (unités/mg)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
6	3.16 ± 10^{-2}	5.547 ± 1.78	0.72 ± 10^{-3}	0.129 ± 10^{-3}
7	4.026 ± 10^{-2}	13.25 ± 1.6	1.51 ± 10^{-3}	0.113 ± 10^{-3}
8	7.716 ± 10^{-2}	10.1 ± 3.1	26.79 ± 10^{-3}	2.65 ± 10^{-3}
10	9.846 ± 10^{-2}	19.67 ± 6	8.34 ± 10^{-3}	0.425 ± 10^{-3}

Tableau IV : Données cinétiques du mutant R258M en fonction du pH

3.2.4 Étude cinétique du mutant E187Q et E187A

Nous allons démontrer dans ce qui suit l'implication du Glu-187 dans la stabilisation des charges des deux lysines 229 et 146 et des intermédiaires de la réaction enzymatique ainsi que sa participation au transfert de protons lors de la déshydratation de la carbinolamine. L'activité spécifique du E187Q est 10^3 fois plus faible que celle de l'aldolase native, ce qui confirme l'implication du Glu-187 dans les étapes du mécanisme catalytique. Le profil de la variation de l'activité en fonction du pH montre qu'il y a une forte activité

vers les pH acides, diminuant d'un facteur de 10 au-dessus du pH 6 et variant peu vers les pH basiques. Le même comportement est observé avec la variation du K_m en fonction du pH (Figure 21). L'étude de la variation de l'activité spécifique du mutant E187Q en fonction du pH est résumée dans le tableau V.

pH	Activité spécifique (unités/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} / K_m ($s^{-1} \mu M^{-1}$)
5	0.0788 ± 10^{-3}	$0.2076 \pm 2.6 \cdot 10^{-3}$	141.41 ± 32	0.00147
5.5	0.0244 ± 10^{-3}	$0.0642 \pm 2.6 \cdot 10^{-3}$	33.05 ± 2.7	0.00194
6	0.0123 ± 10^{-3}	$0.0323 \pm 2.6 \cdot 10^{-3}$	13.05 ± 1.9	0.00248
6.5	0.0103 ± 10^{-3}	$0.0271 \pm 2.6 \cdot 10^{-3}$	15.62 ± 0.2	0.00173
7	0.0072 ± 10^{-4}	$0.0189 \pm 2.6 \cdot 10^{-4}$	13.09 ± 5.6	0.00144
8	0.0062 ± 10^{-4}	$0.0162 \pm 2.6 \cdot 10^{-4}$	11.14 ± 0.8	0.00127
8.5	0.0037 ± 10^{-4}	$0.0096 \pm 2.6 \cdot 10^{-4}$	7.29 ± 3.7	0.00132
9	0.0040 ± 10^{-4}	$0.0106 \pm 2.6 \cdot 10^{-4}$	5.22 ± 0.2	0.00203
10	0.0036 ± 10^{-4}	$0.0096 \pm 2.6 \cdot 10^{-4}$	5.04 ± 1.8	0.00190

Tableau V : Données cinétiques du mutant E187Q en fonction du pH.

Les valeurs de pK_a , calculées à partir de la variation de l'activité spécifique et du rapport k_{cat}/K_m par rapport au pH sont représentées dans le tableau VI. La variation de l'activité spécifique A_s , du K_m et du rapport k_{cat}/K_m du mutant E187A en fonction du pH est similaire à celle de E187Q (Figure 22). L'affinité K_m de l'enzyme mutante E187A pour son substrat est du même ordre que celle de l'aldolase native, par contre dans le cas du mutant E187Q, celle-ci est inférieure. Ce phénomène est probablement dû au changement conformationnel de la Lys-107 chez E187Q et/ou à un changement de son état d'ionisation qui seront décrits ultérieurement dans la section 3.7.4.

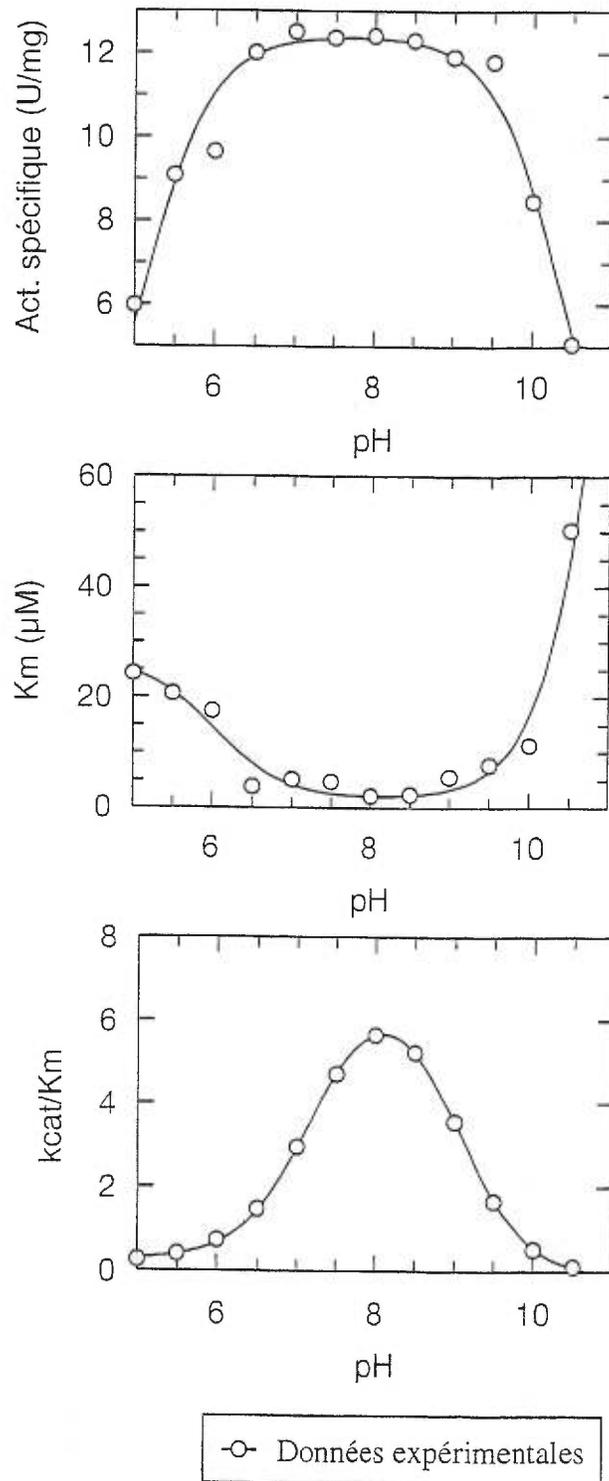


Figure 20 : Profils de pH de l'aldolase du muscle de lapin native.

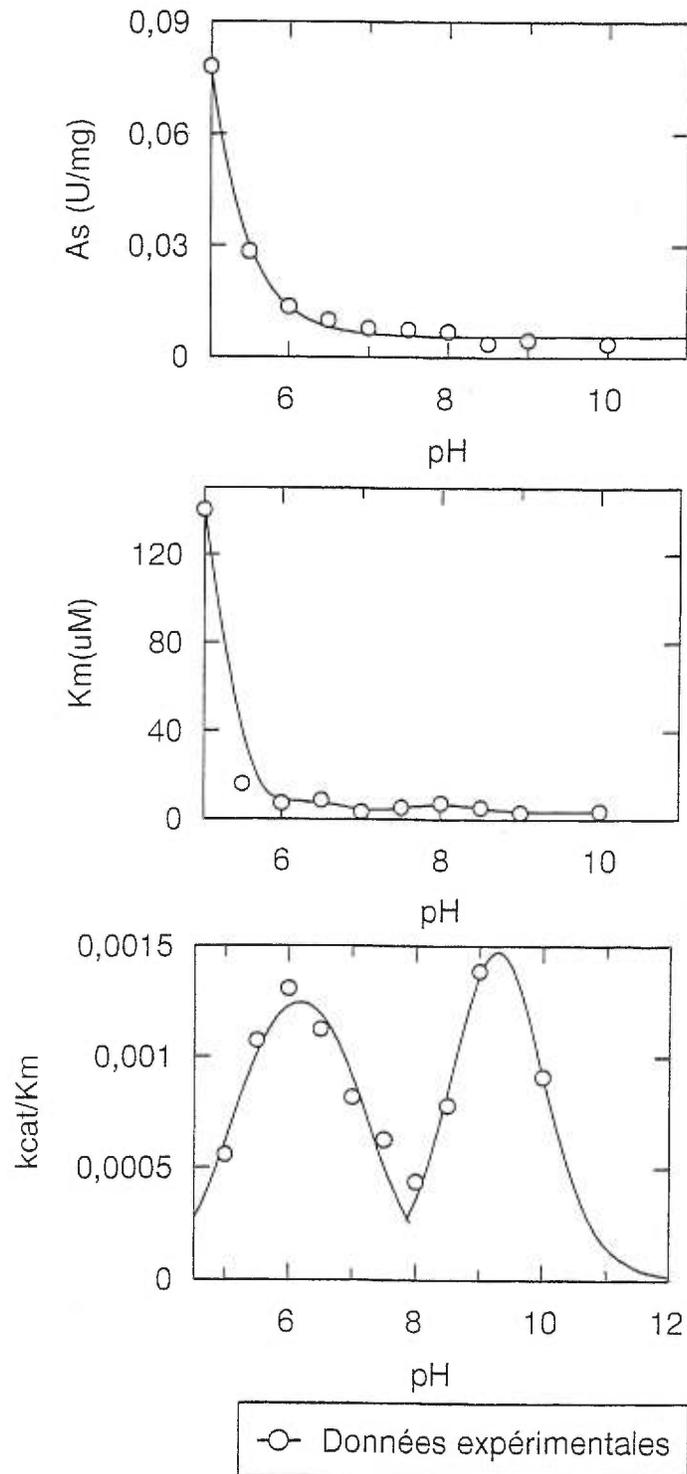


Figure 21 : Profils de pH du mutant E187Q de l'aldolase du muscle de lapin

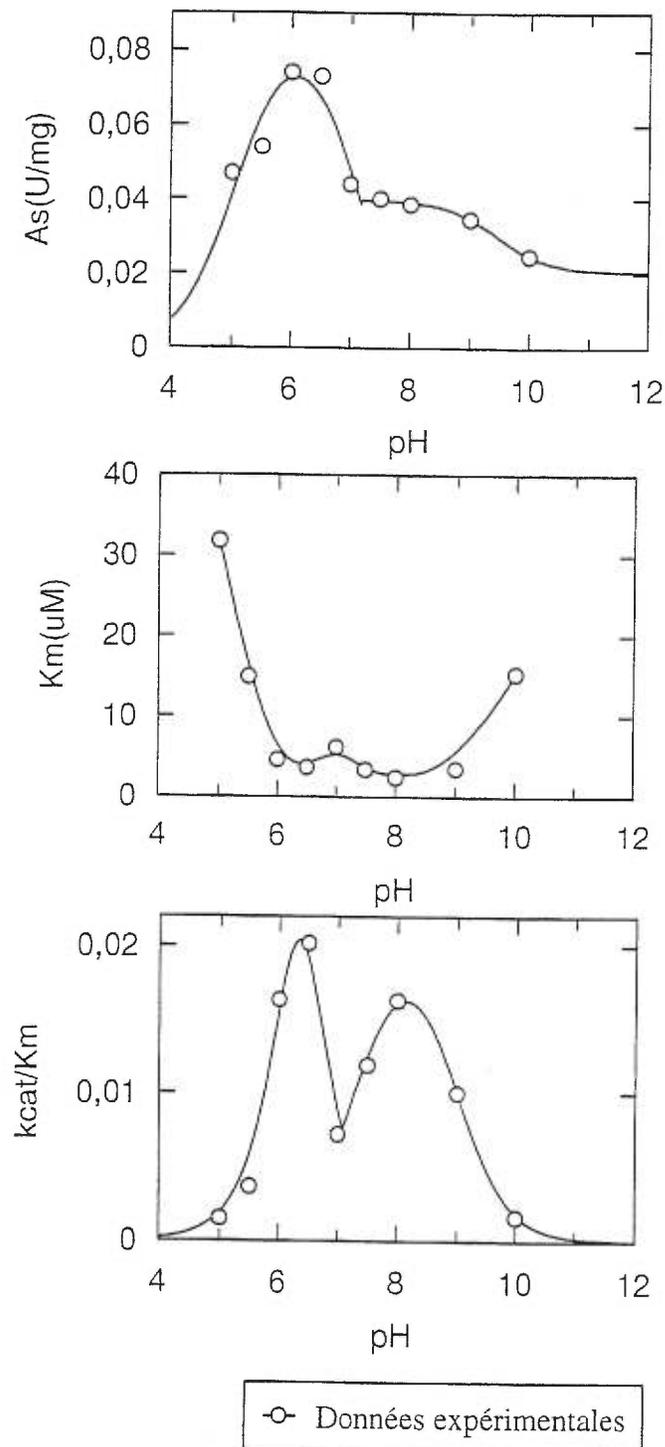


Figure 22 : Profils de pH du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin

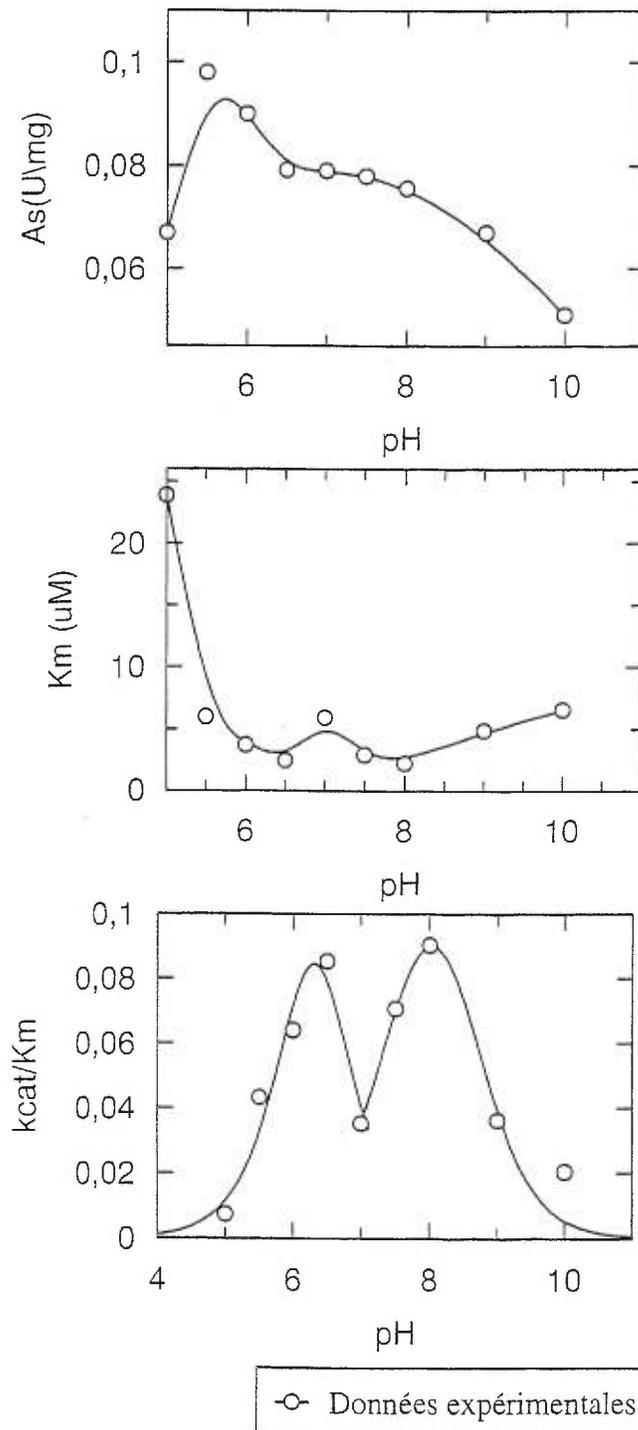


Figure 23 : Profils de pH du mutant E187D de l'aldolase du muscle de lapin

Afin de connaître les états d'ionisation des résidus qui gèrent l'activité et l'affinité de l'enzyme pour son substrat lorsque le glutamate est muté, les valeurs de pKa apparent de l'aldolase native et des mutants E187Q, E187A et E187D ont été calculées. Les valeurs de ces pKa ont été déterminées à partir de la variation de l'activité spécifique et du rapport k_{cat}/K_m en fonction du pH. Les profils de pH du mutant E187D sont similaires à ceux de E187A (Figure 23).

Protéine	K_m (μ M)	Activité spécifique (unités/mg)	pKa de l'activité spécifique	pKa du k_{cat}/K_m
Native	5.08	11	5.09 – 10.36	7.09 – 9.02
E187Q	13	0.007	5.7	(a) 5.1 – 7.2 ; (b) 8.7 – 9.8
E187A	6.13	0.044	5.03 – 7.1 9.43	(c) 6.1 – 6.6 ; (d) 7.45 – 8.9
E187D	5.99	0.079	4.55 – 7.54 5.69 – 9.34	(e) 6.26 – 6.6 ; (f) 7.44 – 8.6

Tableau VI : Paramètres cinétiques de l'aldolase native et des mutants du résidu Glu-187 à pH 7.

Le déplacement de l'activité spécifique de E187Q vers les pH acides et l'instabilité des enzymes de couplages (TIM-GDH) en dessous de pH 5 nous permet uniquement de déterminer le premier pKa correspondant au substrat FBP (Figure 21). Ce déplacement est également observé chez les mutants E187A et E187D, mais il est moins dirigé vers les pH acides qu'il ne l'est chez le mutant E187Q (Figure 21 et 23). La valeur de pKa calculée à partir de l'activité spécifique du mutant E187A et E187D montre que contrairement à l'aldolase native, il y a existence de trois valeurs de pKa. Ceci est dû à des changements d'états d'ionisations de groupements fonctionnels qui sont différents de ceux observés chez l'aldolase native et qui affectent l'activité de l'enzyme.

La variation du rapport k_{cat}/K_M en fonction du pH montre l'existence de deux courbes en cloches avec deux maximums (Figure 21 à 23) dans le cas de ces trois mutants E187A, E187Q et E187D. Les valeurs de pKa calculées sont différentes de celles de l'enzyme native. Cette différence du profil de k_{cat}/K_M en fonction du pH par rapport à celui de l'enzyme native est due soit à la présence de deux formes ionisées d'un groupement impliqué dans la catalyse, soit à des changements conformationnels dans le site actif. Ces deux hypothèses, tenues responsables des différences observées dans les paramètres cinétiques des deux mutants E187A et E187Q seront analysées.

Les basses valeurs de pKa déterminées à partir de l'activité spécifique et du rapport k_{cat}/K_m du mutant E187A et E187Q correspondent probablement à celles d'un résidu acide. Le glutamate étant muté par un résidu neutre chez les mutants E187A et E187Q, le seul résidu anionique qui reste dans le site actif est l'Asp-33. Le résidu aspartate dont normalement le pKa est de 3.96 (Voet and Voet., 1990) est l'Asp-33. Ce résidu peut avoir subi un changement d'état d'ionisation suite à la mutation du Glu-187, qui a affecté son pKa. Nous allons dans la suite, grâce aux études structurales, vérifier ces hypothèses dans le cas des mutants E187A et E187Q.

Les hautes valeurs de pKa déterminées sont probablement celles des résidus lysines ou arginines du site actif. Ces lysines sont la Lys-146, la Lys-229 ou la Lys-107 et les arginines sont les Arg-303 et Arg-148. La connaissance de la structure des mutants E187A et E187Q devra éclaircir leurs comportements cinétiques. Cependant, avant d'aborder la partie structurale, nous exposerons les résultats de l'étude cinétique d'échange isotopique afin de compléter le volet enzymologique.

3.3 Cinétique d'échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$ et $^1\text{H}/^2\text{H}$

Les variations en fonction du temps de la quantité de DTAP sont calculées par deux méthodes. D'abord par la diminution du DTAP en solution puis par la formation de l'eau tritiée au cours du temps. La courbe tracée à partir de ces valeurs représente la moyenne entre la courbe correspondant à la variation du DTAP et de l'eau tritiée (Figures 24 à 28). La

quantité de tritium échangée au cours du temps $Q(T2O)_t$ varie d'une manière exponentielle. La quantité corrigée s'écrit : $v.t = A_0 (1 - e^{-kt})$, avec A_0 étant la limite à t infini et k étant la constante de vitesse de premier ordre qui est donnée par la valeur de la pente. La constante k est calculée à partir de la constante de vitesse de la réaction mesurée en présence de l'enzyme moins celle de la réaction d'échange isotopique mesurée en absence de l'enzyme et qui correspond au bruit de fond. La vitesse de la réaction d'échange isotopique $^3H/^1H$, V_T est égale à la pente A_0k à temps t nulle et elle est exprimée en $\mu\text{mol} / \text{mg min}$. L'incubation du DTAP dans des conditions similaires à celles du mélange réactionnel en l'absence de l'enzyme montre que seulement 4% de la quantité totale du tritium 3H ont été échangées. En présence de l'enzyme, 96% du pourcentage total de tritium ont été échangés. Il est donc évident que cet échange isotopique $^3H/^1H$ est catalysé par l'aldolase. La vitesse de la réaction d'échange isotopique $^3H/^1H$ catalysée par l'aldolase native et certains de ses mutants est présentée dans le tableau VII. Les résultats de l'analyse des échanges isotopiques suite à l'incubation du DTAP en présence de l'aldolase native pendant une durée supérieure à 5 heures, montrent que plus de 65% des échanges ont eu lieu.

La vitesse d'abstraction du tritium en position C_3 du DHAP en fonction du temps dans le cas de l'aldolase native et des mutants étudiés varie d'une façon exponentielle et atteint un plateau de saturation à des temps différents (Figures 24-28). En effet, ce plateau dépend de la constante de vitesse (k) et de la quantité d'enzyme utilisée. Dans le cas des mutants K146M, E187Q, D33N et S271A, il est atteint après 4000, 1400, 1300 et 1200 min, alors que pour le mutant K146A et D33S il est difficilement atteint même après une durée de 4000 min. La valeur de l'échange isotopique maximale mesurée correspond à une limite, qui peut varier entre 53 et 100% de l'échange global du tritium. Pour les mutants K146A et D33S, la vitesse d'échange isotopique du $^3H/^1H$ étant énormément affectée, rend le plateau de saturation difficilement accessible. Nous remarquons qu'après une durée de 4000 min à 20°C, l'inactivation de l'enzyme commence à augmenter considérablement et contribue à l'augmentation de l'erreur sur la mesure de la réaction d'échange isotopique. C'est pour cette raison que la vitesse V_T est calculée uniquement sur la base des mesures collectées de 0 à 4000 min.

Protéine	A_s (unités/mg)	Q_p (mg)	V_T ($\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_D ($\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
Native	12.5	$0.7 \cdot 10^{-3}$	7.7123 ± 0.00031	13.8
D33N	0.003	0.5	0.00376 ± 0.00013	0.08
D33S	0.002	0.5	0.00053 ± 0.00018	0.001
S271A	0.007	0.5	0.005 ± 0.003	N_d
K146A	0.004	1	$7.06 \cdot 10^{-5} \pm 2.66 \cdot 10^{-6}$	N_{dt}
K146M	0.002	0.5	$0.00308 \pm 4.45 \cdot 10^{-5}$	0.002
K107M	0.07	0.18	0.01288 ± 0.00038	0.57
E187Q	0.0048	0.25	0.02178 ± 0.00021	0.003
E187A	0.044	0.0125	$0.01228 \pm 1.007 \cdot 10^{-7}$	0.39

Tableau VII : Vitesses des échanges isotopiques $^3\text{H}/^1\text{H}$ et $^1\text{H}/^2\text{H}$ en position C_3 du DHAP catalysés par l'aldolase native et ses mutants.

A_s : activité spécifique du clivage du substrat FBP.

Q_p : quantité d'enzyme utilisée.

V_T : vitesse d'échange isotopique du tritium par l'hydrogène.

V_D : vitesse d'échange isotopique de l'hydrogène par le deutérium.

N_d : vitesse d'échange non déterminée en raison de la transformation rapide du DHAP en méthylglyoxal et en orthophosphate catalysée par le mutant S271A.

N_{dt} : vitesse d'échange non déterminée.

L'analyse des résultats illustrés dans le tableau VII montre que la vitesse de la réaction d'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ est du même ordre que celle de la réaction d'échange $^3\text{H}/^1\text{H}$ uniquement chez l'aldolase native et le mutant E187Q. Dans le cas des autres mutants, les vitesses observées avec l'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ sont plus élevées que celles avec $^3\text{H}/^1\text{H}$. Or étant donné que la vitesse d'échange isotopique $^1\text{H}/^2\text{H}$ correspond non pas à l'arrachement du deutérium mais à sa fixation, cette expérience ne permet pas de déceler un effet isotopique entre le tritium et le deutérium mais elle permet par contre d'avoir des informations complémentaires à la réaction d'échange $^3\text{H}/^1\text{H}$.

Dans le cas des mutants étudiés de l'aldolase du muscle, nous allons analyser les résultats de la manière suivante. D'abord voir la mutation qui affecte la vitesse de cette étape catalytique de l'arrachement du pro-S. La seconde étape est la détermination de la nature des mutations qui peuvent catalyser l'échange de l'hydrogène pro-R du carbone C_3 du DHAP. Notons que la triose phosphate isomérase catalyse l'échange de l'hydrogène pro-R du carbone C_3 du DHAP. La vitesse d'échange isotopique $^1\text{H}/^2\text{H}$ mesurée correspond à la capture d'un deutérium par l'énamine et non pas celle de l'arrachement du deutérium en cette position pro-S (Azema., non publié). Cette expérience permet toutefois de connaître si des réactions secondaires ont lieu comme c'est le cas du mutant S271A qui sera analysé dans la suite. Les résidus mutés, peuvent donc provoquer une déstabilisation du DHAP. Ces mutations montreront la nature du résidu directement impliqué dans cette étape du mécanisme. Il est donc important de noter que le rôle des acides aminés dans le site actif peut être multiple. Il se situe aussi bien au niveau de la stabilisation des intermédiaires réactionnels qu'au niveau de la catalyse elle-même et sera révélée par l'analyse suivante :

En présence du DTAP, l'expérience d'échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$ montre une importante réduction de cette vitesse lorsque les résidus Asp-33, Lys-146 sont mutés (Tableau VII). Cependant, il est important d'analyser les profils de la variation de l'eau tritiée en fonction du temps dû à la réaction d'échange isotopique catalysée par l'aldolase sur le DTAP. Dans le cas du mutant K146A, on remarque que la vitesse d'échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$ est linéaire. Elle correspond à une vitesse catalytique d'ordre nulle ou l'enzyme subie

un changement conformationnel avant de catalyser le substrat DHAP. La vitesse d'échange isotopique V_T du mutant K146A est une vitesse d'ordre zéro déterminé à partir de la variation linéaire au court du temps de la quantité de tritium échangé. La structure tridimensionnelle du mutant K146A montre la fixation du FBP dans le site actif dans une conformation différente de celle observée chez l'aldolase de foie de lapin de type sauvage et qui peut ne pas correspondre au complexe Michaelis puisque la Lys-229 est proche du groupement phosphate et non du carbonyle du carbone C_2 pour former la base de Schiff (Choi et al., 1999). Ce mutant ne sera pas comparé aux autres mutants.

Les deux mutants qui affectent également la constante catalytique k_{cat} sont le D33S, D33N, K146M. On remarquera que le mutant D33S est celui qui possède la vitesse V_T la plus faible par rapport aux autres mutants. L'Asp-33 est sans aucun doute le résidu responsable de l'effet stéréoélectronique de l'échange de l'hydrogène pro-S du carbone C_3 de l'énamine.

Le mutant K146M affecte la vitesse d'échange isotopique $^3H/^1H$, mais avec une vitesse inférieure à celle du mutant D33N et D33S. Il est donc probable que la Lys-146 soit impliquée uniquement dans la stabilisation du DHAP. L'expérience de l'échange isotopique du DTAP avec le tritium en position pro-R montre que le mutant K146M échange le tritium pro-R avec une vitesse de 0.01 ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$) alors que pour le mutant D33S, cette vitesse est plus faible et elle est de l'ordre de $2.3 \cdot 10^{-4}$ ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$). Dans le cas du mutant E187Q l'échange isotopique du pro-R est quasi nul (annexe 4 et 5). Notons qu'aucun effet isotopique n'a été mesuré pour l'échange de l'hydrogène pro-R du DHAP catalysée par l'aldolase de type sauvage. Ces résultats montrent que la Lys-146 est responsable de l'effet stéréoélectronique de l'échange de l'hydrogène pro-S du DHAP.

Les structures 3D des aldolases de classe I montrent que la Lys-146 interagit avec le carbonyle du carbone C_2 et la Ser-271 avec le groupement phosphate du DHAP chez l'aldolase du foie de lapin (Blom, non publié). Le résidu Asp-33, stabilise le carbonyle du DHAP chez l'aldolase du muscle de lapin (Blom et al., 1997). L'échange de l'hydrogène pro-

R observé chez le mutant D33S est faible par rapport à celui du mutant K146M et il est en accord avec le rôle que joue l'Asp-33 dans le maintien du DHAP dans la conformation qui permet l'échange de l'hydrogène axial par rapport au plan formé par les carbones du DHAP. L'Asp-33 a donc un effet stéréoelectronique sur cette réaction. Son rôle se situe plus à ce niveau que dans la sélectivité vis à vis de l'hydrogène pro-S ou pro-R arraché.

La Lys-146 est donc responsable de l'orientation des hydrogènes du carbone C₃ de manière à ce que l'hydrogène pro-S soit orienté dans le plan aux carbones C₁-C₂-C₃ du DHAP et qui lui permet d'être échangé avec le solvant. La perte de cette interaction par la mutation engendre l'échange des deux hydrogènes pro-R et pro-S. L'échange isotopique ³H/¹H du pro-R catalysé par K146M est plus rapide que celui de l'hydrogène pro-S avec le solvant. Ceci montre que la Lys-146 est le résidu responsable de la catalyse d'échange de l'hydrogène pro-S et non pas du pro-R du carbone C₃ du DHAP avec le solvant par l'aldolase. La Lys-146 assure la stéréospécificité de cette réaction.

La mutation de l'Asp-33 par une serine et celle de la Lys-146 par une alanine engendre d'importants changements dans le site actif des mutants D33S et K146A. Ceci explique les différences de vitesse k_T mesurées pour D33S et K146A par rapport à celles des mutants D33N et K146M. En effet, la mutation d'une lysine par une méthionine chez l'aldolase du muscle de lapin engendre peu de changements conformationnels dans le site actif qui a été déterminé structuralement dans le cas du mutant K107M et K229M.

Les mutations des trois autres résidus Lys-107, Glu-187 et Ser-271 affectent moins brutalement la vitesse que ne le fait les mutants D33S et K146M. Il est très probable que ces trois résidus jouent un rôle dans la stabilisation du DHAP dans le site actif.

Les mutants D33S, D33N et S271A n'échangent pas la quantité totale de DTAP en solution (Figure 25-28). Dans le cas du mutant S271A, 70% du DTAP est transformée en DHAP. Ceci peut être dû à une inhibition de l'enzyme par le méthylglyoxal formé à partir du DHAP par des réactions para-catalytiques qui donnent lieu à l'inactivation de l'enzyme (Grazi et al., 1979). Par contre dans le cas des deux mutations de l'Asp-33, seulement 50 à 60

% du DTAP est transformé. Ceci est dû à des réactions secondaires dont la nature reste à déterminer.

Les échanges isotopiques $^1\text{H}/^2\text{H}$ obtenus pour le mutant S271A révèle l'implication de cette sérine dans la formation du complexe de l'aldolase et du DHAP (Azéma, non publié). En effet, l'aldolase en présence du DHAP forme quatre complexes. D'abord le complexe de Michaelis, suivi par celui de la base de Schiff, ensuite de celui de l'énamine et un quatrième sous forme d'énamine et phosphate. Le quatrième complexe est rendu possible par une lente formation du méthylglyoxal et du phosphate (orthophosphate) catalysée par l'aldolase (Figure 24). Ce dernier provient de la β - élimination du phosphate de l'énamine (Kuo et al., 1984). Le méthylglyoxal ne représente pas plus de 4% de l'ensemble des complexes dans le cas de l'enzyme de type sauvage (Iyengard et Rose et al., 1981).

La mutation de la Ser-271 en alanine aboutit à la formation majoritaire du méthylglyoxal et de l'orthophosphate (Azéma., non publié). Cette sérine induit une importante perturbation de l'échange du proton pro-S liée à la forte déstabilisation de l'énamine chez ce mutant. Cette mutation empêche la co-planarité du groupement phosphate du DHAP et favorise ainsi la réaction d'élimination du phosphate inorganique.

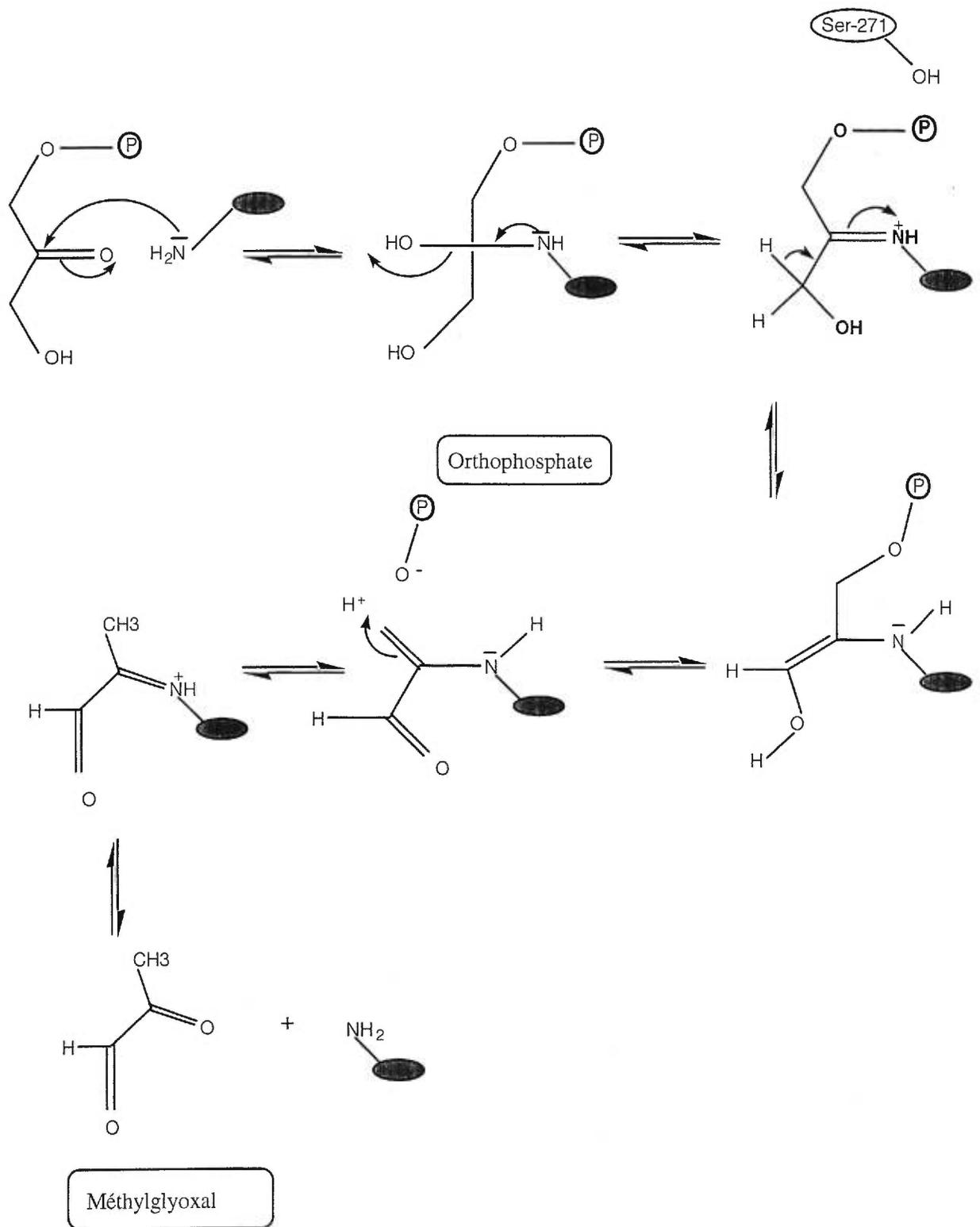


Figure 24 : Formation du méthylglyoxal et de l'orthophosphate à partir du DHAP

La réaction catalysée par l'aldolase sur le DHAP présente l'intermédiaire sous la forme de carbinolamine, de base de Schiff puis d'énamine. La détermination de la quantité de base de Schiff, nous permet d'évaluer la vitesse réelle d'échange du proton pro-S (Sygusch et Beaudry, non publié). Cette expérience nous permet de connaître le pourcentage réel de base de Schiff Q_{BS} formée à l'équilibre.

Les pourcentages des intermédiaires covalents enzyme-substrat sous forme de base de Schiff Q_{BS} sont déterminés par précipitation acide en présence du DHAP marqué au ^{32}P (Tableau VII). Ce pourcentage permet de déterminer le coefficient d'efficacité catalytique de la réaction d'abstraction du proton pro-S. Ce coefficient est k_e calculé à l'aide de l'équation du rapport entre la vitesse k_T (s^{-1}) et du pourcentage de la base de Schiff formée.

$$k_e = (k_T * 100) / Q_{BS} \quad (s^{-1})$$

Protéine	k_T (s^{-1})	Q_{BS} (%)	Q_e (%)	k_e (s^{-1})
WT	20.566	3.19	38.22	644.712
D33N	0.0100	0.77	3.55	1.303
D33S	0.00142	0.94	2.7	0.1517
K146A	0.000188	0.099	14.31	0.1901
E187Q	0.058	3.345	10.7	1.7365
E187A	0.03276	0.764	<i>Nd</i>	4.288

Tableau VIII : Vitesse d'échange isotopique $^3H/^1H$ corrigée en fonction de la quantité de base de Schiff formée lors de la réaction.

WT : aldolase de type sauvage.

Q_{BS} : quantité d'intermédiaire de DHAP marqué au ^{32}P sous forme de base de Schiff obtenue à partir de la quantité d'enzyme initiale Q_T (Sygusch et Beaudry., non publié).

Q_e : quantité d'intermédiaire de DHAP marqué au ^{32}P sous forme d'énamine obtenue à partir de la quantité d'enzyme initiale Q_T (Sygusch et Beaudry., non publié).

k_e : efficacité catalytique de l'abstraction de l'hydrogène pro-S calculée à partir de l'équation du rapport entre la vitesse k_T et du pourcentage de base de Schiff formée.

Les corrections apportées à la vitesse d'échange isotopique du tritium en fonction du nombre réel de bases de Schiff formées lors de la réaction catalytique de l'aldolase sur le DHAP sont citées dans le tableau VIII. Ils permettent de mesurer l'efficacité catalytique k_e d'échange $^3H/^1H$ du tritium en C_3 du DHAP dans le cas de certains mutants. On remarque que l'efficacité catalytique la plus faible est celle du mutant D33S. Sachant que K146A engendre d'importants changements dans le site actif qui affectent d'ailleurs énormément le

nombre de bases de Schiff formées (Tableau VIII). Ces résultats confirment que l'Asp-33 est le résidu qui catalyse l'échange de l'hydrogène pro-S du DHAP.

D'autre part, la mutation de la Lys-146 et de l'Asp-33 engendre la plus importante baisse du facteur k_e , qui est en accord avec la diminution du nombre de complexes aldolase-DHAP sous forme de base de Schiff dans ces deux mutants. La Lys-146 et l'Asp-33 ont un facteur k_e presque identique. Cependant on remarque que le mutant D33S engendre beaucoup plus l'accumulation du DHAP sous forme de base de Schiff que le mutant K146A. Tandis que chez le mutant K146A c'est l'énamine qui s'accumule le plus. Ceci implique donc un rôle différent de ces résidus dans la stabilisation des intermédiaires réactionnels (Base de Schiff et énamine).

L'hypothèse de l'implication directe d'un résidu du site actif dans l'arrachement de l'hydrogène pro-S du DHAP longuement proposée dans la littérature est donc totalement inexistante et doit être remplacée par l'effet de stabilisation du complexe aldolase-DHAP par les résidus Lys-146 et Asp-33 de manière à favoriser le déroulement de l'échange de l'hydrogène pro-S.

D'autre part, la mutation de la Lys-146 engendre une importante baisse du facteur k_e , qui est principalement due à la diminution du nombre de complexes aldolase-DHAP sous forme de base de Schiff. La Lys-146 en plus de son effet stéréoélectronique dans l'arrachement de l'hydrogène pro-S du DHAP, elle contribue probablement à la déstabilisation de la base de Schiff de manière à favoriser la formation de l'énamine.

Nous avons donc montré que la Lys-146 est responsable de la stéréospecificité de la réaction de l'échange de l'hydrogène pro-S du DHAP avec le solvant et que l'Asp-33 est responsable de l'effet stéréoélectronique de cette réaction.

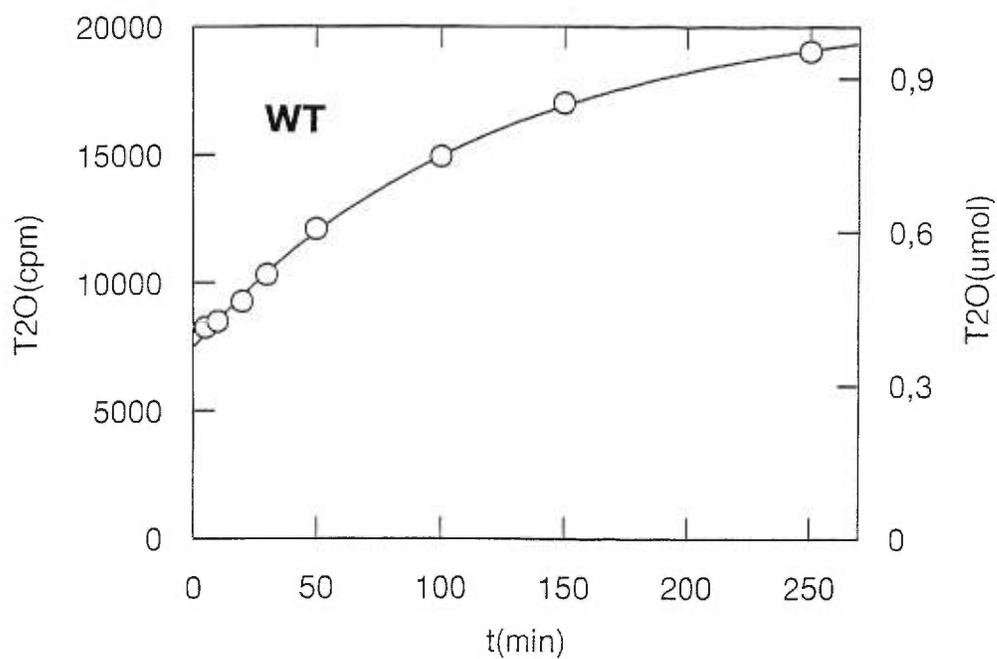


Figure 25 : Variation de la quantité de T2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP.

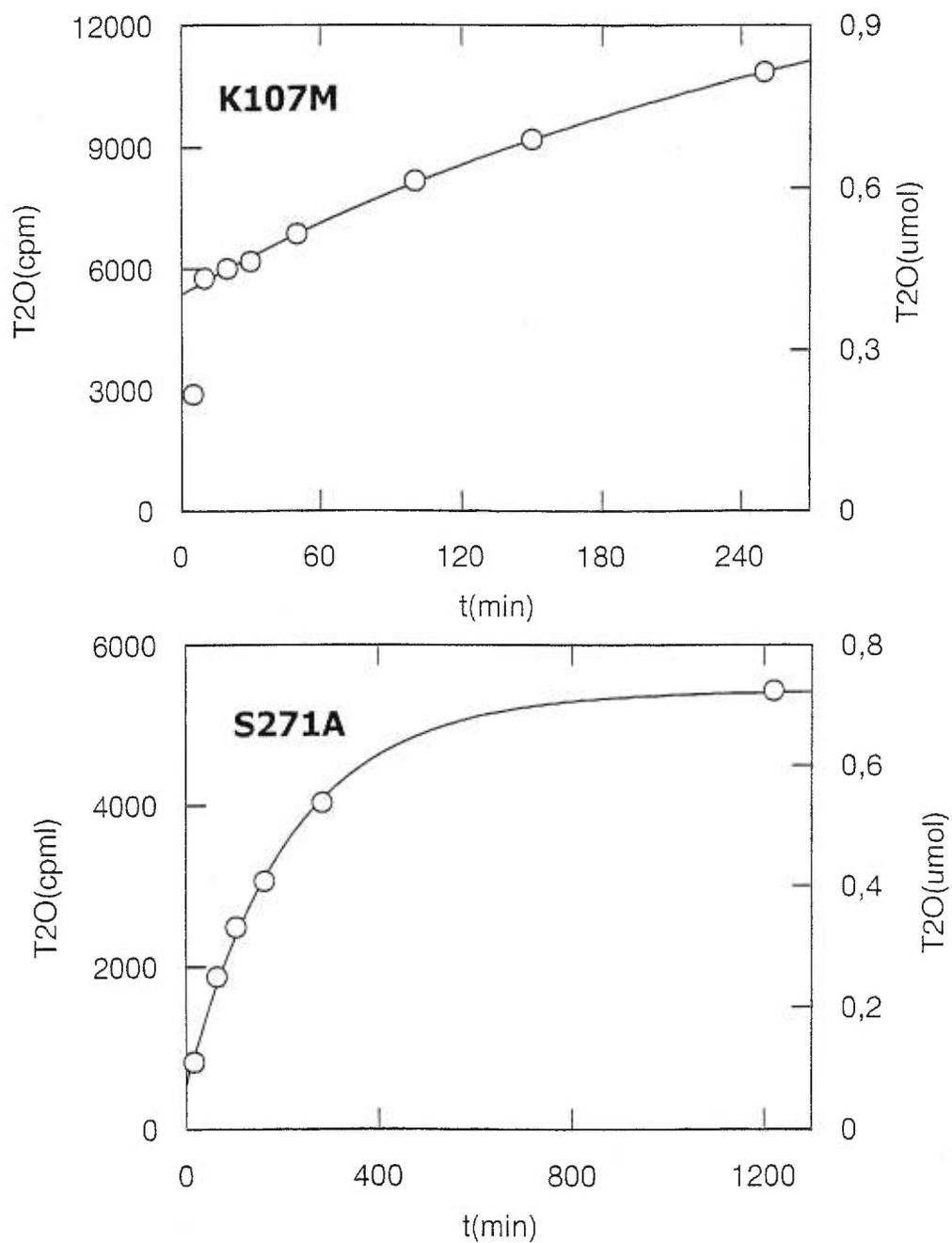


Figure 26 : Variation de la quantité de T2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants K107M et S271A de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP.

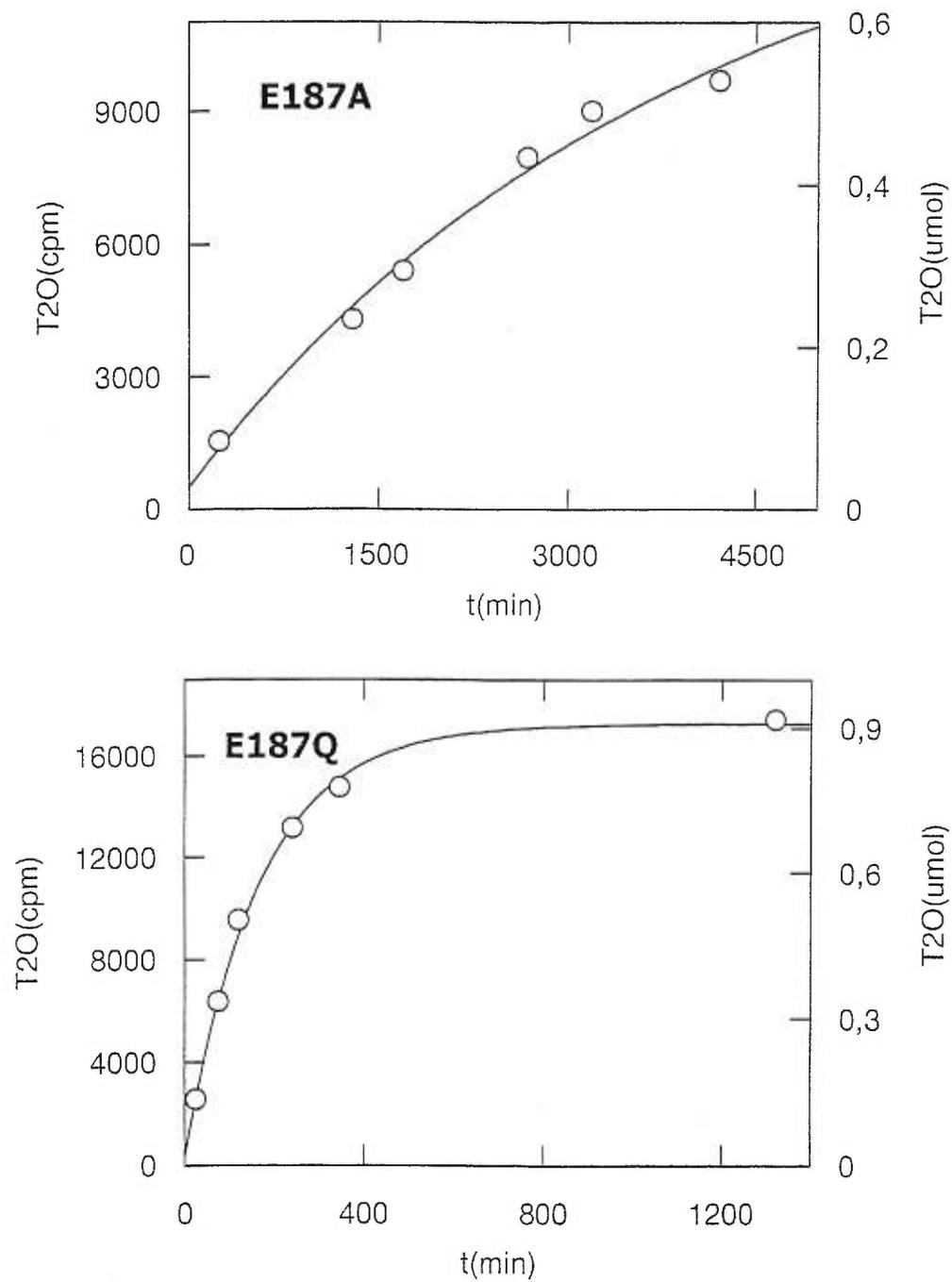


Figure 28 : Variation de la quantité de T2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants E187A et E187Q de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP.

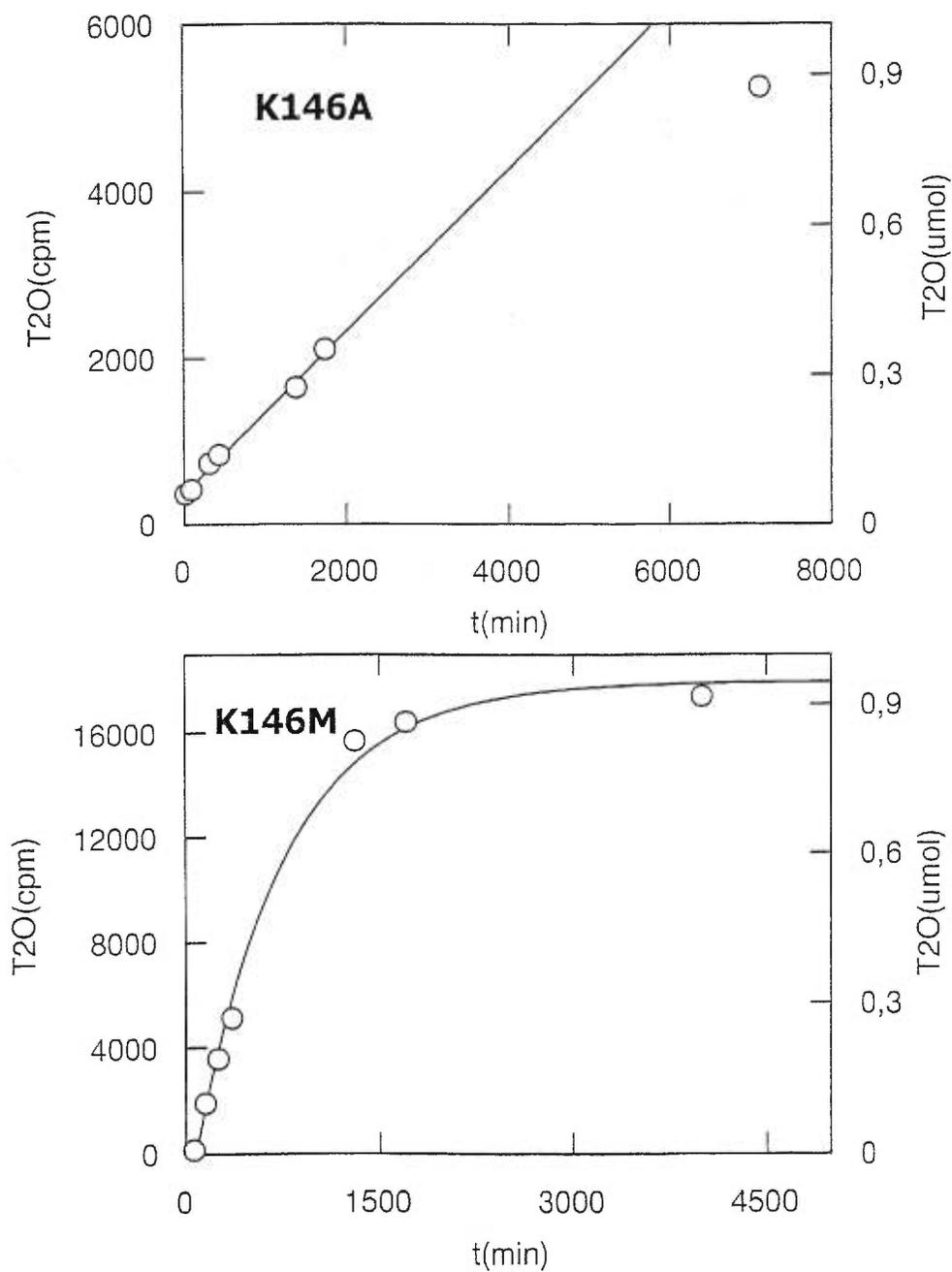


Figure 27 : Variation de la quantité de T2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants K146A et K146M de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP.

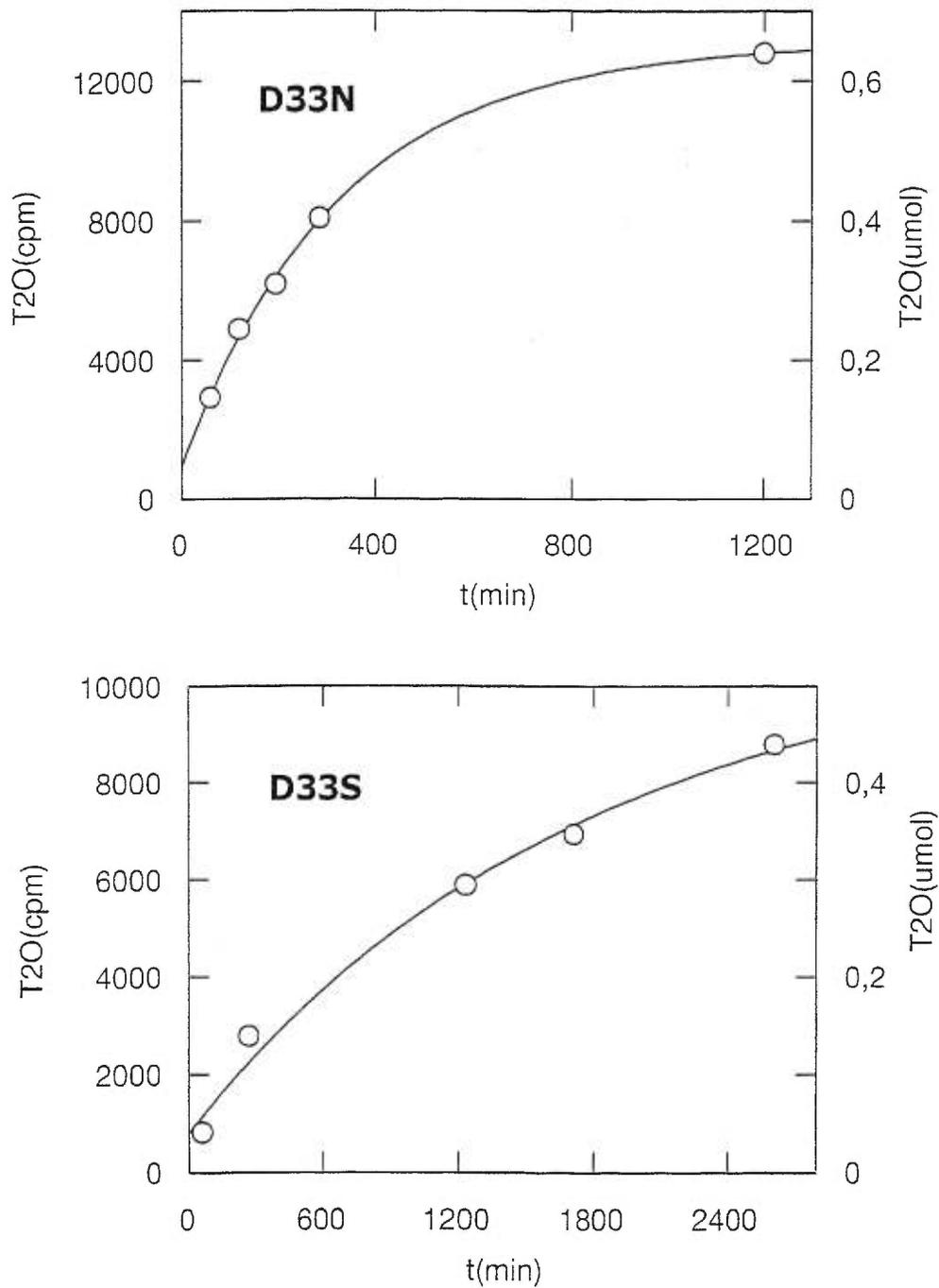


Figure 29 : Variation de la quantité de T2O en fonction du temps suite à la réaction d'échange isotopique catalysée par les mutants D33N et D33S de l'aldolase du muscle de lapin sur le DTAP.

3.5 Résultats de la cristallogénèse de l'aldolase native et mutante

Pour aborder cette seconde partie complémentaire à l'étude cinétique de l'aldolase native et mutante, l'obtention de cristaux qui diffractent à haute résolution est primordiale. Les techniques de cristallisation par "Batch", par diffusion vapeur en gravité et par diffusion des liquides en microgravité décrites dans le chapitre précédent nous ont permis d'obtenir de nouvelles formes cristallines.

3.5.1 Cristallisation par la méthode "Batch"

Les cristaux de l'aldolase native et ceux des mutants obtenus à partir du protocole cité ultérieurement ont la même forme cristalline en forme de plaquette. La concentration de la solution de cristallisation des mutants est différente de celle de la native. Elle varie de 5.5 mg/ml pour K107M, E187A, D33S, D33N, S271A et E187Q et 4 mg/ml dans le cas des mutants K229M, K146A et K146M. Les cristaux apparaissent après 48 heures et continuent leur croissance jusqu'à ce qu'ils atteignent la dimension maximale de 1.5 x 1 x 0.2 mm après un délai d'une semaine à 22 °C (Figure 30). La stabilité n'est atteinte qu'au bout d'un mois. Cette stabilité est nécessaire à la manipulation des cristaux et les rend plus résistants lors de leur montage dans les capillaires en quartz, à la congélation et à la diffusion des ligands pour former des complexes.



Figure 30 : Cristaux de l'aldolase native et mutante (K229M, K107M, K146M, D33N, E187Q, E187A, S271A) obtenus par la méthode "Batch" dans le sulfate d'ammonium à 29 °C (gauche). Forme finale du cristal après enlèvement des macles, dimension (0.7 x 0.5 x 0.2 mm)(droite).

3.5.2 Cristallisation par diffusion vapeur

Les résultats obtenus à partir de plusieurs essais de cristallisation dans différentes conditions décrites dans le manuel "Screen I and II" (Hamptom research, 1994) montrent que la croissance cristalline est favorisée à faible température. C'est la raison pour laquelle le nombre de conditions ayant donné des cristaux à 4°C est supérieur à celui obtenus à 29 °C. Notons qu'un large " Screen " autour des conditions, ayant donné des cristaux de petites tailles, nous a permis d'obtenir une nouvelle forme cristalline utilisable pour la diffraction aux rayons X.

Ces nouveaux cristaux ont été obtenus par deux conditions distinctes utilisant le PEG20K et PEG8K/Éthylène glycol comme agent précipitant. Notons qu'en présence du PEG8K, les cristaux ont un pouvoir de diffraction qui diffère selon le tampon utilisé (Tableau IX).

Nous nous sommes intéressés aux conditions contenant l'ion acétate qui favorise la cristallisation de l'aldolase dans différentes conditions et qui est soupçonné d'avoir une certaine compétitivité avec la partie C-terminale. En effet la présence d'ions acétate peut conférer à cette partie une conformation différente qui est intéressante à l'analyse. La caractérisation de ces nouvelles formes cristallines se résume dans le tableau X. Ayant eu l'opportunité de faire des expériences de cristallisation en microgravité, j'ai étudié l'effet de cette dernière sur ces nouvelles formes.

3.5.3 Cocrystallisation

Notre intérêt pour la cristallisation de l'aldolase avec certains inhibiteurs a pour but de comprendre les types d'interactions mises en jeux. Elle est effectuée par deux méthodes essentielles : la cocrystallisation et le "soaking". Les ligands utilisés sont le DHAP-phosphonate (Blonski et al., 1995), le DHAP, le D- Erythrose-phosphate (Ferroni et al., 1991) , le FBP et l'Hexitol-1,6-bisphosphate (Ginsburg et al., 1966).

Les cristaux des complexes obtenus par 'Soaking' et qui diffractent à haute résolution, sont ceux cristallisés dans le sulfate d'ammonium (forme III). Ces cristaux pour lesquels la cocrystallisation n'a pas abouti à des cristaux, résistent faiblement à la présence d'un substrat ou inhibiteur. Ils subissent des fissures à cause des changements structuraux engendrés par les ligands. Certains des ligands induisent la dégradation des cristaux lors du 'soaking' (Tableau XI). Ce phénomène est probablement dû à un changement conformationnel de l'enzyme puisque plusieurs conditions ont été testées. Étant donné ces résultats, la cocrystallisation a été utilisée comme deuxième alternative

Les conditions de cristallisation de la nouvelle forme en présence du PEG utilisé pour la cocrystallisation de l'aldolase avec certains ligands, ont donné des cristaux qui sont maclés, inutilisables pour la diffraction. Par contre, ceux obtenus par "soaking" ne subissent pas de dégradation physiologique et sont utilisés dans la diffraction aux rayons X. Cependant, il s'avère que malgré leur résistance, ces cristaux avec et sans ligands ont une courte durée de vie sous l'effet des rayons X. En plus, les données obtenues à partir de ces cristaux sont à faible résolution et ne permettent pas de poursuivre l'étude cristallographique. C'est effectivement le cas des cristaux de complexes décrits dans le tableau XI. L'aldolase native a été cocrystallisée dans les conditions correspondant à la forme I et II et particulièrement à pH de 7.5 favorisant la formation de la base de Schiff. Les résultats sont résumés dans le Tableau XI.

Agent précipitant	Tampon	Résolution (Å)
PEG8K/Ethylene Glycol 12%/10%	Cacodylate (100mM) pH 6.5	10
PEG8K/Ethylene Glycol 12%/10%	Hépes (100mM) pH 7.5	4 -5

Tableau IX : Variation de la résolution en fonction du tampon

Agent précipitant	Tampon	Cp (mg/ml)	Caractéristique des cristaux	Résolution (Å)
PEG8K/Ethyl Glycol	Hépes pH 7.5	5	Bipyramidaux	4-5
PEG8K/isopropanol	Cacodylate pH 6.5	5	Bipyramidaux plus réguliers	10
PEG20K	MES pH 6.5	5	Idem	10
PEG20K/Ethyl Glycol	MES pH 6.5	5	Idem, plus maclés	10

Tableau X : Caractérisation des cristaux obtenus par les nouvelles conditions de cristallisation

La résolution de ces cristaux a été obtenue grâce au détecteur "Hi Star" par A. Zdanov (Macromolecular Structure Laboratory, NCI- Frederick Cancer Research and development Center). (Communication privé, 1995).

Protéine/Ligands	Solution de cristallisation	Résolution (Å)	Méthode de cristallisation	Caractéristique des cristaux
Aldolase/DHAP (1mM)	PEG20K	10 - 11	Cocristallisation	Réguliers
Aldolase/Hexitol-1,6-bisphosphate (100µM)	PEG20K	4 - 5	Cocristallisation	Réguliers
Aldolase/Hexitol-1,6-bisphosphate (100µM)	AmS	2.4	"Soaking"	Réguliers
Aldolase/ FBP (1mM)	PEG20K	10 -11	Cocristallisation	Réguliers
Aldolase/4-deoxy phosphate	43% AmS	10 -11	"Soaking"	Degradation
D33N/DHBA-P	43%AmS	10 -11	"Soaking"	Degradation
K229M/Hexitol-1,6-bisphosphate	43%AmS	2.6	"Soaking"	Réguliers

Tableau XI : Résultats de cristallisation de complexes de l'aldolase native et mutante

Avec,

Aldolase : aldolase de type sauvage

AmS : Sulfate d'ammonium

DHBA-P : DHAP phosphonate

3.6 Cristallisation en microgravité

Les cristaux obtenus en microgravité ne sont pas forcément plus larges que les cristaux terrestres mais ils ont un pouvoir de diffraction plus haut et une meilleure qualité cristalline.

3.6.1 Cristallisation en microgravité à 4°C

L'aldolase native purifiée, a été cristallisée dans la forme I et II en présence d'agents précipitants PEG20K et PEG8K dans les conditions décrites précédemment. La technique "step gradient" (SP) est celle qui a donné des cristaux en microgravité. Cette technique a permis d'obtenir des cristaux dans trois conditions de cristallisation différentes citées dans le tableau XII, XIII.

Les cristaux obtenus en microgravité en nombre et en taille sont comparables à ceux obtenus par la méthode "Batch". Cependant, ils ont la caractéristique d'avoir un pouvoir de diffraction plus élevé (Tableau XV). Le patron de diffraction de ces deux formes cristallines est illustré dans la Figure 31, 32. Les cristaux de l'espace ont une dimension moyenne de 0.7 x 0.5 x 0.3 mm. L'effet de la microgravité a donc surtout un impact sur le pouvoir de diffraction des cristaux plutôt que sur leur taille.

3.6.2 Cristallisation en microgravité à 22°C

Les cristaux obtenus en microgravité ne sont plus en forme de plaquette, la croissance est plus régulière dans les trois dimensions. Ils sont obtenus par la technique "step gradient" (SP) (Tableau XIV). Ces cristaux sont plus stables et ont une durée de vie plus longue sous les rayons X. Les cristaux, de tailles comparables à ceux cristallisés dans la même période sur terre ont été caractérisés immédiatement après la mission spatiale. Cependant, bien que le pouvoir de diffraction de ces cristaux reste similaire entre terre - espace, leur moisaïcité s'est beaucoup plus améliorée.

3.6.3 Mesure de la mosaïcité

Les cristaux d'aldolase obtenus sur terre et en microgravité de même dimension sont comparés et analysés par la suite. Ces derniers sont montés dans des capillaires en quartz pour la mesure de leur mosaïcité qui s'effectue grâce au détecteur "Image Plate". La mosaïcité a été évaluée en mesurant les courbes "rocking widths" correspondant au profil des réflexions provenant de chacun des cristaux terrestres et de l'espace. Ces profils sont tracés par une courbe Gaussienne. Les valeurs de la largeur à la mi-hauteur (HW) de cette gaussienne pour une même réflexion sont respectivement de l'ordre de 0.16° et de 0.08° .

Ces résultats montrent que les cristaux terrestres ont deux fois moins de mosaïcité que ceux de l'espace. Nous constatons aussi que les deux pics de ces courbes sont très rapprochés et de même amplitude. Ceci est dû à un pouvoir de diffraction similaire des deux cristaux. Cependant, la différence entre la largeur des courbes est principalement liée à l'augmentation de l'ordre cristallin grâce à la microgravité (Figure 33).

Forme I	Concentration en protéine (mg)	Concentration de PEG20K (%)	Tampon MES pH 6.5 (M)	Volumes (µl)
Conditions à l'équilibre	10	14	0.1	250
Bloc du Haut	20	4	0.1	125
Bloc du Bas	-----	24	0.1	125
Solution de Récupération	-----	14	0.1	500

Tableau XII : Conditions de cristallisation de l'aldolase native en microgravité en présence du PEG20K à 4°C

Forme II	Concentration en protéine (mg)	PEG8K/Ethylène Glycol (%)	Tampon Hepes pH 7.5 (M)	Volumes (µl)
Condition à l'équilibre	10	10 / 8	0.1	250
Bloc du Haut	20	4 / 8	0.1	125
Bloc du Bas	-----	16 / 8	0.1	125
Solution de récupération	-----	10 / 8	0.1	500

Tableau XIII : Conditions de cristallisation de l'aldolase native en microgravité en présence du PEG8K à 4°C

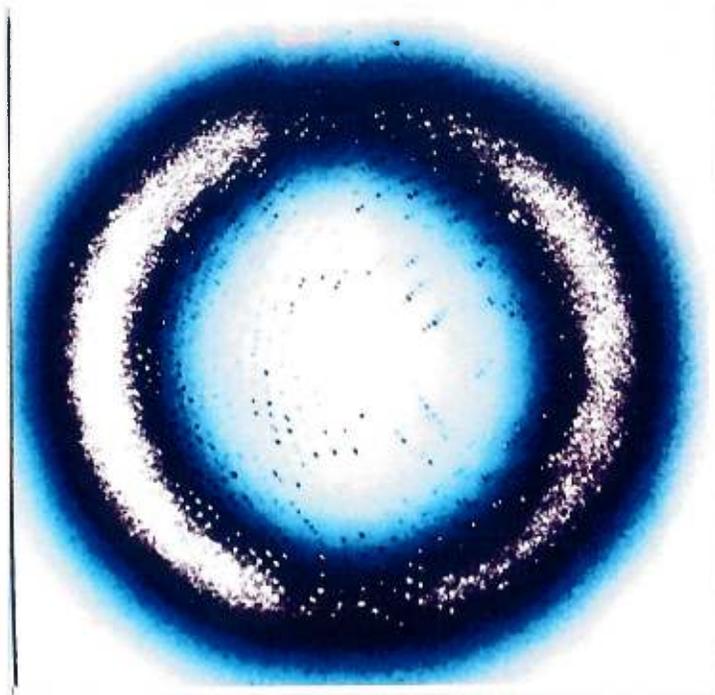


Figure 31 : Patron de diffraction des cristaux de l'aldolase du muscle de lapin native de dimension (0.7 x 0.6 x 0.3 mm) obtenu en microgravité dans du PEG8K à 4°C et qui diffractent à 2.7 Å de résolution.

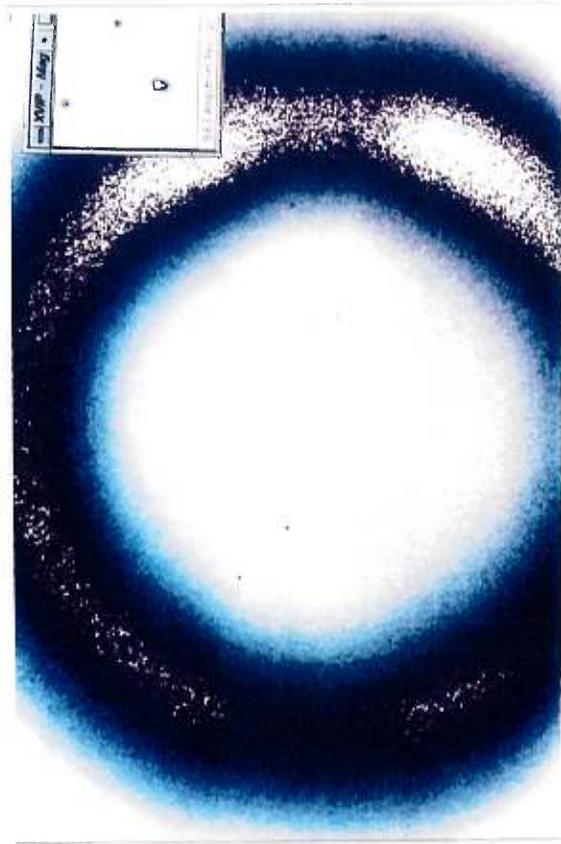


Figure 32 : Patron de diffraction des cristaux de l'aldolase du muscle de lapin native de dimension (0.9 x 0.65 x 0.3 mm) obtenu en microgravité dans du PEG20K à 4°C et diffractant à basse de résolution.

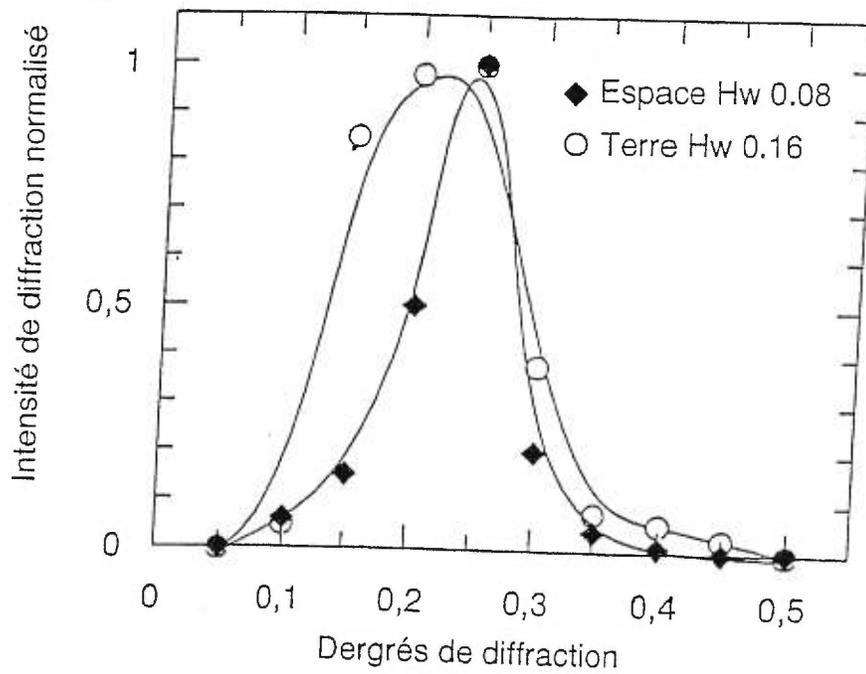


Figure 33 : La comparaison du profil correspondant à la mosaïcité des cristaux terrestres et ceux de l'espace pour une même réflexion.

Forme III	Concentration en protéine (mg)	Concentration d'AmS (%)	Tampon TEA pH 7.4 (M)	Volumes (μ l)
Conditions à l'équilibre	5.2	43.21	0.1	234.5
Bloc du Haut	9.6	40	0.1	127
Bloc du Bas	-----	47	0.1	107.5
Solution de récupération	-----	43.21	0.1	2 000

Tableau XIV : Condition de cristallisation de la forme III de l'aldolase à 22°C en microgravité.

Conditions de cristallisation	Résolution (Å) "Cristaux en microgravité "	Résolution (Å) "Cristaux terrestres"
Forme I PEG8K/Ethylène Glycol	5	2.7
Forme II PEG 20K	Pas de patron de diffraction	5

Tableau XV : Pouvoir de diffraction des cristaux de l'espace et terrestres.

3.6.4 Discussion

Les cristaux de l'aldolase du muscle obtenus avec la technique de diffusion en solution en microgravité présentent plusieurs aspects de la microgravité sur la cristallisation des protéines. L'amélioration de la qualité cristalline observée est en accord avec celle obtenue dans le cas d'autres protéines aussi bien dans notre laboratoire (Endopeptidase neutre (NEP), Aldolase d'*E. coli*) que dans la littérature pour d'autres protéines (Lysozyme, Thaumatin,...) (Ng et al., 1997).

Cette étude a montré que la microgravité peut se présenter sous différents aspects (mosaïcité, résolution). Ces effets peuvent être présents d'une manière simultanée ou pas selon, non seulement le type de protéine, mais aussi le type de cristaux étudiés. C'est le cas de l'aldolase ou chaque forme cristalline possède un effet différent lié à la microgravité.

Cependant, il est clair que la microgravité engendre une amélioration générale de l'ordre cristallin interne. Cette amélioration peut aussi bien être au niveau du pouvoir de diffraction qu'au niveau de la mosaïcité. Elle peut aussi être au niveau de la régularité de la croissance cristalline qu'au niveau de l'augmentation de la résistance des cristaux vis-à-vis des rayons X. Ces résultats démontrent l'effet de la microgravité sur l'augmentation de l'ordre cristallin des cristaux de l'aldolase du muscle.

Par ailleurs, si l'effet de la microgravité a été montré une fois de plus dans notre cas chez l'aldolase de muscle, les causes de ces phénomènes restent encore inconnues et sont sujettes à d'intenses recherches sur plusieurs protéines dans différents laboratoires à travers le monde.

Les cristaux obtenus aussi bien en microgravité qu'au laboratoire vont être caractérisés par diffraction aux rayons X. Les données cristallographiques collectées seront analysées et affinées jusqu'à l'obtention d'un modèle final pour chaque mutant ou complexe de haute qualité cristallographique.

Une analyse détaillée des sites actifs, des parties C-terminales et des régions ayant subi d'importants changements conformationnels sera réalisée. Afin de mettre en évidence l'effet de chaque mutation sur la structure de l'enzyme, une comparaison des structures mutantes et native sera effectuée.

3.7. Structures tridimensionnelles de certains mutants et complexes de l'aldolase de muscle de lapin

3.7.1 Données cristallographiques

Les cristaux des mutants cités-ci après, sont obtenus par la technique de cristallisation par "Batch". Ces mutants sont K229M, D33N, D33S, K107M, S271A, E187Q, E187A, R258M. Seuls les mutants E187A et D33N ont été cristallisés dans en microgravité. La dimension maximale de ces cristaux est de 1.5 x 0.6 x 0.2 mm. Ces cristaux sont taillés. Leur dimension finale est de 0.6 x 0.5 x 0.12 mm et ils sont montés dans des capillaires en quartz pour être utilisés dans la diffraction aux rayons X. La collecte des données pour les mutants K229M, D33N, K107M, E187Q, E187A, K146M, K229M-hexitol-1,6-bisphosphate et le complexe aldolase native-l'hexitol-1,6-bisphosphate s'est effectuée grâce au détecteur "Hi Star" par A. Zdanov (Macromolecular Structure Laboratory, NCI- Frederick Cancer Research and development Center). Tous ces cristaux qui ont poussé en microgravité et au laboratoire sont isomorphes à ceux de l'enzyme native. Ils ont le même groupe d'espace monoclinique et les paramètres de maille ont une faible déviation moyenne d'environ 1.5 Å pour a, b et c, et 1° pour l'angle β par rapport à ceux de l'aldolase native. Ces résultats sont résumés dans le tableau XVI.

L'étude structurale que nous allons traiter par la suite s'est effectuée sur les protéines dont les données de rayons X sont complètes et qui sont : les complexes (K229M-hexitol-1,6-bisphosphate) et (aldolase native-Hexitol-1,6-bisphosphate) ainsi que les mutants K229M, K107M, E187A et E187Q. Les mutants D33S, D33N, K146M, S271A, R258M ont des données cristallographiques sont difficilement exploitables.

Protéines	Résolution (Å)	"Completeness" (%)	NC	Caractéristiques
E187A	2.19	81	1	Croissance cristalline en microgravité
E187Q	2.0	83	1	Cristallisé au laboratoire
K229M	2.6	84	1	Idem
(K229M-hexitol-1,6- bisphosphate)	2.4	82	1	Idem
K107M	2.46	82	1	Idem
D33N	2.2	60	2	Données de diffraction incomplètes
K146M	2.1	40	1	Cristal cassé
(WT-hexitol-1,6- bisphosphate)	2.6	84	1	Cristallisé au laboratoire

Tableau XVI : Résultats de diffraction des cristaux des mutants de l'aldolase de muscle

Avec, NC le nombre de cristaux collectés

(K229M-hexitol-1,6-bisphosphate) : complexe entre le mutant K229M de l'aldolase et l'hexitol-1,6-bisphosphate.

(WT-hexitol-1,6-bisphosphate) : complexe entre l'aldolase native et l'hexitol -1,6-bisphosphate.

"Completeness" : le pourcentage des données complètes.

3.7.2 Données structurales

La structure de l'aldolase native est utilisée comme modèle initial pour le calcul direct des phases intervenant dans la méthode de Remplacement Moléculaire décrite précédemment et réalisée par le programme X-PLOR Version 3.1 (Brünger et al, 1992). Grâce à cette stratégie, nous avons déterminé une carte de densité électronique initiale de ces mutants qui s'est avérée interprétable pour tous les résidus du tétramère sauf pour la partie C-terminale formée par les résidus de 344 à 363. Cette partie est caractérisée par une grande flexibilité (Sygusch et al., 1987) et adopte différentes conformations. Elle nécessite donc d'être rebâtie entièrement avec le programme "O". L'analyse de la carte de densité électronique $|F_o| - 2|F_c|$ de chaque mutant montre clairement une densité électronique qui prouve l'existence des mutations ciblées dans chaque cas ainsi que le réarrangement global des résidus du site actif dans le cas de certains mutants (E187A et E187Q).

L'analyse structurale se base principalement sur la comparaison des résidus qui peuvent jouer aussi bien un rôle dans le mécanisme catalytique que sur la conformation de l'aldolase. Les différentes interactions (liaison hydrogène, liaison de Van Der Waals, liaison électrostatique,...) peuvent varier d'une structure à une autre et ont un important impact sur l'efficacité catalytique de l'enzyme.

La première caractéristique structurale de ces quatre mutants, contrairement à l'aldolase native, est de ne pas posséder de DHAP dans leurs sites actifs. Cette analyse, va nous permettre de connaître les changements conformationnels qui gèrent la fixation du DHAP et les facteurs qui gèrent le choix des conformations A, B et C du DHAP (Blom et al., 1997).

L'examen de la carte de densité électronique lors des étapes finales de l'affinement et de modélisation de chaque mutant montre que la partie C-terminale résidus (344-363) à une densité électronique de plus en plus localisée. Cette dernière a été, lors des premières étapes d'affinement, difficilement interprétable (discontinue). Ce n'est qu'après avoir placé ces résidus dans la densité électronique correspondante et corrigé leur position après chaque

étape d'affinement, qu'ils ont commencé à avoir une densité électronique continue à partir du résidu 344 jusqu'au 363.

Les parties de la structure qui ont nécessité un nombre important de corrections par modélisation et de repositionnement des résidus sont les deux hélices alpha formées par les résidus 30-40 et 310-320. Ces deux hélices dont les résidus ont subi un important changement aussi bien des chaînes latérales que principale forment un passage entre la surface de l'aldolase et son site actif. Ces hélices, possédant des résidus qui interagissent en même temps avec le site actif et la partie C-terminale, sont sensibles aux réarrangements du site actif dû à la mutation.

L'analyse des structures du mutant E187A, E187Q, K107M, K229M et celle des complexes de l'aldolase native et mutante avec l'hexitol-1,6-bisphosphate est décrite dans les paragraphes qui suivent.

3.8 Étude structurale du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin

3.8.1 Introduction

L'étude du mutant E187A s'inscrit dans le cadre de deux principaux volets. Le premier volet est consacré à la compréhension du comportement cinétique de E187A en présence de son substrat le FBP analysé précédemment. Le second volet est consacré à l'étude de ses caractéristiques structurales qui serviront à mieux comprendre les études cinétiques.

L'étude cinétique du mutant E187A a montré à partir de la détermination de la variation du V_{\max} , du K_m et du rapport k_{cat}/K_m en fonction du pH, quatre points importants que nous allons énumérer brièvement.

- 1 L'implication du Glu-187 dans l'activité catalytique. En effet la mutation du Glu-187 par une alanine engendre une importante baisse d'activité (As du mutant E187A est de 0,04 Unités /mg).
- 2 L'existence de quatre valeurs de pKa au lieu de deux seulement chez l'aldolase native. Ceci est due probablement à un réarrangement du site actif de E187A qui est responsable de la modulation de pKa de certains résidus du site actif. Ces pKa (6.5, 5.5, 7.9 et 9.3) et (6.1, 6.6, 7.45 et 8.9) déterminées à partir de la variation de l'activité spécifique et de celle de k_{cat}/K_m en fonction du pH respectivement, peuvent correspondre soit à des états intermédiaires ou à des résidus du site actif. Ceux déterminés à partir de l'activité spécifique correspondent au groupement immomium du FBP ou DHAP sous forme de base de Schiff ou à des résidus du site actif. Ces résidus peuvent être soit des lysines (Lys-146, Lys-229, Lys-107), des résidus anioniques (Asp-33, Glu-189 et Asp-109) ou des arginines (Arg-148, Arg-303 et l'Arg-42). Les pKa déterminés à partir du facteur k_{cat}/K_m correspondent aux résidus qui gèrent la fixation du DHAP et la libération du FBP ainsi que celle du GAP ainsi qu'au complexe FBP sous forme de base de Schiff protonnée. Le mécanisme catalytique de ce mutant ne pourra être éclairci que par sa structure tridimensionnelle.

- 3 L'activité de E187A, supérieure à celle de E187Q et principalement dans D₂O, postule l'implication d'une molécule d'eau dans le mécanisme enzymatique de E187A (Article1, annexe1).
- 4 Le déplacement de la variation de l'activité spécifique et du k_{cat}/K_m en fonction du pH vers le côté acide montre une diminution des pKa du complexe et /ou des résidus du site actif qui affectent la catalyse enzymatique de ce mutant ainsi que celle de E187Q et E187D (section 3.2).

Il découle de ces résultats cinétiques des mutants E187A, E187Q et E187D un déplacement de la variation de l'activité spécifique en fonction du pH vers les pH acides. Ceci nous permet de postuler la principale hypothèse de la diminution du pKa de la Lys-229 qui forme la base de Schiff avec le substrat. Ceci peut être la conséquence du rapprochement de son groupement ammonium avec celui d'une autre lysine chargée proche qui n'est autre que la Lys-146. Cette hypothèse a été proposée par Westheimer: pour l'acétoacétate décarboxylase (Kokesh et al., 1971). Celui-ci a postulé que la proximité de deux lysines, soit 115 et 116 dans le site actif et ainsi que dans la séquence primaire, engendre par la proximité d'un groupement ammonium chargé la diminution du pKa d'une des deux lysines. En effet, l'acétoacétate décarboxylase est une enzyme dont la catalyse implique la formation d'une base de Schiff entre son substrat et la lysine 115 du site actif. Démonstré par liaison d'un chromophore (2,4-dinitrophenyl propionate), le pKa de la Lys-115 est de 6 (Lane et al., 1996). Ce résultat, appuie l'hypothèse de Westheimer ; le rapprochement de la Lys-115 et 116 du site actif induit la diminution du pKa de la Lys-115, situation favorable pour que cette dernière procède à l'attaque nucléophile sur le substrat pour former la base de Schiff.

Ce comportement est aussi fréquent chez les métalloprotéines dont l'ovotransferrine, une enzyme impliquée dans le transport du Fe³⁺ et ayant une activité antimicrobienne. Cette enzyme, dont le rapprochement du groupement Nz de deux lysines, implique le mouvement de deux domaines structuraux qui gèrent la capture ou la libération du Fe³⁺ (Dewan et al., 1993).

La stratégie utilisée pour analyser les hypothèses que nous avons émises à partir des données structurales est l'analyse de la structure tridimensionnelle du mutant E187A affinée à 2.15 Å. La comparaison détaillée avec la structure de l'aldolase native révélera les changements conformationnels impliqués dans le comportement cinétique de E187A. Ils vont également démontrer pour la première fois l'hypothèse de Westheimer d'une manière structurale dans le cas des protéines dont la catalyse fait appel à la formation d'une base de Schiff.

3.8.2 Résolution et affinement de la structure 3D du mutant E187A

Le mutant E187A, contrairement aux autres (E187Q, K229M et K107M), est celui dont le site actif a subi le plus de changements. Ceci explique donc les valeurs élevées du (R_{free} , R_{fact}) lors des premiers cycles d'affinement (37.8%, 37.5%). Les valeurs finales obtenues à la suite de plusieurs cycles d'affinement sont présentées dans le tableau XVII. Le diagramme de Ramachandran, illustré dans la figure 34 révèle la qualité du modèle dont la plupart des résidus ont des angles (Phi, Psi) situés dans les zones déterminées dans la base de données des protéines (Ramachandran et al., 1968).

3.8.3 Analyse de la structure 3D du mutant E187A

La mutation du glutamate en alanine, de rayon de Van Der Waals beaucoup plus faible, a abouti à un réarrangement des résidus voisins du site actif pour combler l'espace libéré. Le déplacement moyen des carbonnes C_{α} des résidus équivalents par rapport à ceux de l'aldolase native est de 0.7 Å, partie C-terminale exclue (Figure 35). Elle a induit l'établissement de nouvelles liaisons hydrogènes, ioniques ou des contacts hydrophobes. La comparaison de la structure de la native et celle du mutant pour chaque sous-unité est décrite ci-dessous :

Sous-unité 1. L'analyse du site actif montre que la cavité libérée par la mutation est occupée par une molécule d'eau, proche de l'emplacement ultérieur du carbonyle du Glu-187 dans l'aldolase native (Figure 36). Cette molécule d'eau à une position idéale pour transférer

son proton au substrat (FBP ou DHAP). La lysine 146 possède deux conformations, la 1^{ère}, où elle subit une rotation de 60 ° autour de la liaison C_γ - C_δ pour s'orienter vers la Lys-229 à une distance de 3 Å de leur groupement ε- ammonium. Ce rapprochement est cohérent avec la diminution du pKa d'une des lysines qui présente un état non protonné au pH de cristallisation de 7,5. La 2^{ème} conformation de la Lys-146 l'oriente vers le groupement carboxyle de l'Asp-109. Dans ces deux conformations, la Lys-146 perd l'interaction qu'il avait avec l'Asp-33 chez l'aldolase native. Quant à la Lys-229, elle possède une seule conformation qui est dirigée vers la cavité créée par la mutation et qui l'oriente vers la Lys-146.

Les autres résidus du site actif qui ont subi des changements conformationnels sont la Leu-270, l'Arg-148, la Lys-107, l'Arg-303 et l'Arg-42. La Leu-270 a subi une rotation de sa chaîne latérale de 45° et occupe l'espace libéré par la mutation en se rapprochant ainsi vers la partie hydrophobe de la Lys-229. La Leu-270 augmente l'hydrophobicité de la Lys-229 en diminuant la solvatation de son environnement. Ceci déstabilise la charge positive de son groupement ε-ammonium. L'effet hydrophobe contribue ainsi au déplacement de son pKa vers les pH acides.

L'Arg-148 occupe l'espace libéré par l'absence de ligand dans le site actif et s'oriente plus vers l'intérieur du site actif. Sa chaîne latérale a subi une rotation de 45° à partir de son carbone C_δ et conserve son interaction avec le Glu-189 qui s'éloigne plus encore de la Val-150.

Ce réarrangement dans le site actif permet aux résidus d'occuper une partie de l'espace libéré par l'absence du DHAP et crée un encombrement stérique par rapport à ce dernier. Chez le mutant E187A, deux nouvelles molécules d'eau (H₂O(1382), H₂O(1110)), occupent la densité correspondant aux carbones C₂ et C₃ du DHAP dans l'enzyme native et interagissent avec trois résidus (Ser-300, Lys-146, Arg-148). La Lys-107 dont la chaîne latérale s'est déplacée de 0.83 Å est dirigée vers le carbonyle du Asp-33.

L'hélice, dont les résidus 34 à 49 représentent une partie du passage menant au site actif, a subi un déplacement des chaînes principales de 1.43 à 2.64 Å. Ce phénomène est éventuellement observé dans l'hélice (316-327) qui forme le deuxième côté du passage. Ce déplacement augmente la largeur de ce passage de 1.7 Å (par rapport aux C α des résidus) et change son interaction avec la partie C-terminale.

On note également le déplacement des boucles formées par les résidus (Gly-302, Gly-272 et Ser-271) dont la position gère la stabilisation du groupement phosphate et la sélection du DHAP mono anionique qui est la seule à se rendre jusqu'au site actif.

L'Arg-303 est antiparallèle à l'Arg-42 et conserve son interaction avec le Glu-354 tout en subissant une rotation de 60° de sa chaîne latérale qui se déplace de 5 Å vers l'extérieur du site actif. Elle s'éloigne d'une distance de 6.2 Å au lieu de 3.87 Å chez l'enzyme native de la Gly-273. L'Arg-42 ne change pas de position. En absence du DHAP, l'Arg-42 est repliée vers l'intérieur du site actif et interagit avec le Glu-34, tandis que l'Arg-303 est orientée vers l'extérieur de ce site.

Sous-unité 2. L'analyse du site actif de cette sous-unité montre plusieurs différences qui se situent à plusieurs niveaux. Nous constatons qu'en plus des déplacements des chaînes latérales des résidus, il y a un déplacement global des chaînes principales de 1 à 4 Å. Le site actif présente une expansion des chaînes latérales de ces résidus par rapport à ceux de l'aldolase native (Figure 36).

L'espace libéré par la mutation Glu-187 en Ala est comblé par une molécule d'eau (2553) qui interagit avec le groupement O ϵ_2 du Glu-189 et le Nz de l'Arg-148. Cette molécule d'eau est celle à qui on attribue un rôle catalytique et qui a été mise en évidence dans la sous-unité1.

Les Lys-146, Lys-229 ainsi que l'Asp-33 ont subi des changements conformationnels qui leurs attribuent des interactions différentes de celles qu'ils avaient chez l'aldolase native. La chaîne latérale de la Lys-146 a deux conformations. Dans la 1^{ère} elle a subi une rotation

de 90° autour de la liaison C_δ-C_ε pour former une liaison hydrogène entre son groupement ammonium et celui de la Lys-229. La distance entre leur groupement ε-ammonium est de 2.85 Å. Elles interagissent toutes deux avec une molécule d'eau (2720). La 2^{ème} conformation de la Lys-146 est dirigée vers le groupement du carboxyle de l'Asp-109 et l'Asp-33 (Figure 36). Le changement conformationnel de la Lys-229 est moindre par rapport à celui qu'elle a subi dans la sous-unité 1 et ne libère aucun espace éventuel pour la Leu-270 qui n'a pas changé de conformation. C'est aussi le cas de la Lys-107, dont le N_z pointe toujours vers le carbonyle de l'Asp-33.

Nous constatons que l'Arg-303 s'est plus éloignée du Glu-354 et perd ce lien ionique. L'Arg-303 s'oriente en direction de la Gly-273 (3.11 Å) et interagit à travers une molécule d'eau avec le O_γ de la Ser-300. La distance entre N_z de l'Arg-303 et le C_α du Glu-345 est de 4.43 Å tandis qu'avec le groupement guanidinium de l'Arg-42, elle est de 4.5 Å.

La Ser-271 qui dans l'aldolase native interagit avec le O₂ du DHAP s'est déplacé de 1.6 Å vers l'intérieur du site actif et s'oriente vers le NH du résidu Gly-302 du feuillet β parallèle. Le volume du site actif a connu un rétrécissement dû à l'avancement des C_α de ses résidus. Cet effet crée un encombrement stérique par rapport à la liaison du substrat FBP et du DHAP.

Un changement spectaculaire dans cette sous-unité est la rotation de 90° de la chaîne latérale du Glu-34 qui perd son interaction avec l'Arg-59 et le Gln-306 et s'oriente de façon à se lier uniquement avec des molécules d'eau à l'intérieur du site actif. Ce changement survient suite à la perturbation des états de charges des résidus du site actif due à la mutation. Il permet d'avoir à nouveau un groupement carboxyle dans le site actif qui cependant est situé loin du Glu-187 muté et donc ne peut avoir la même fonction.

Sous-unité 3. Les résidus de cette sous-unité ont subi un changement conformationnel moyen allant de 0.95 à 1.3 Å. cependant, ils ont gardé des interactions similaires à celles qu'ils avaient dans l'aldolase native. La Lys-146 a une conformation

dirigée vers l'Asp-33 ($d = 3.06 \text{ \AA}$ Nz/COOH). Les deux lysines sont parallèles et distantes de 3.8 \AA au lieu de 4.8 \AA dans la native. La Lys-229 a une seule conformation et elle interagit avec trois molécules d'eau dont l'une la sépare de la Ser-300 (Figure 37).

L'Arg-42 et 303 ont subi le plus grand changement conformationnel par rapport aux autres sous-unités. L'Arg-42 s'est orientée vers l'extérieur du site actif et est stabilisée par l'Arg-303 qui devient antiparallèle à celle-ci.

La Lys-107 pointe vers la direction opposée du site actif tout en interagissant uniquement avec le groupement carbonyle de l'Asp-33. L'Arg-303 repliée vers l'Arg-148 laisse une ouverture de 7.5 \AA par rapport au C_{α} de la Gly-354. La partie C-terminale est identique à celle de l'aldolase native.

Dans cette sous-unité la cavité n'est pas occupée par une molécule d'eau à cause du déplacement de la Leu-270 et de la Lys-229 qui occupent la majeure partie de cette cavité.

Sous-unité 4. Les trois principales lysines du site actif ont changé de conformation (Figure 37). L'espace créé par la mutation du Glu-187 en Alanine n'a pas été comblé et la cavité est restée vide. La Leu-270, s'est éloignée de la Lys-229 qui possède deux conformations, l'une est orientée vers la Ser-300 et l'autre vers une molécule d'eau (4381). La distance entre le groupement ϵ -ammonium des Lys-229 et 146 dans les différentes sous-unités est résumée dans le tableau XVIII. Deux nouvelles molécules d'eau apparaissent dans la cavité créée par la mutation dans le site actif, dont l'une est proche du Gln-189 et serait celle qui jouerait un rôle catalytique.

L'Arg-303 a une conformation différente de celle de l'enzyme native et l'Arg-42 en a deux dont l'une est identique à celle dans l'aldolase native. L'Arg-42 reste toutefois antiparallèle à l'Arg-303.

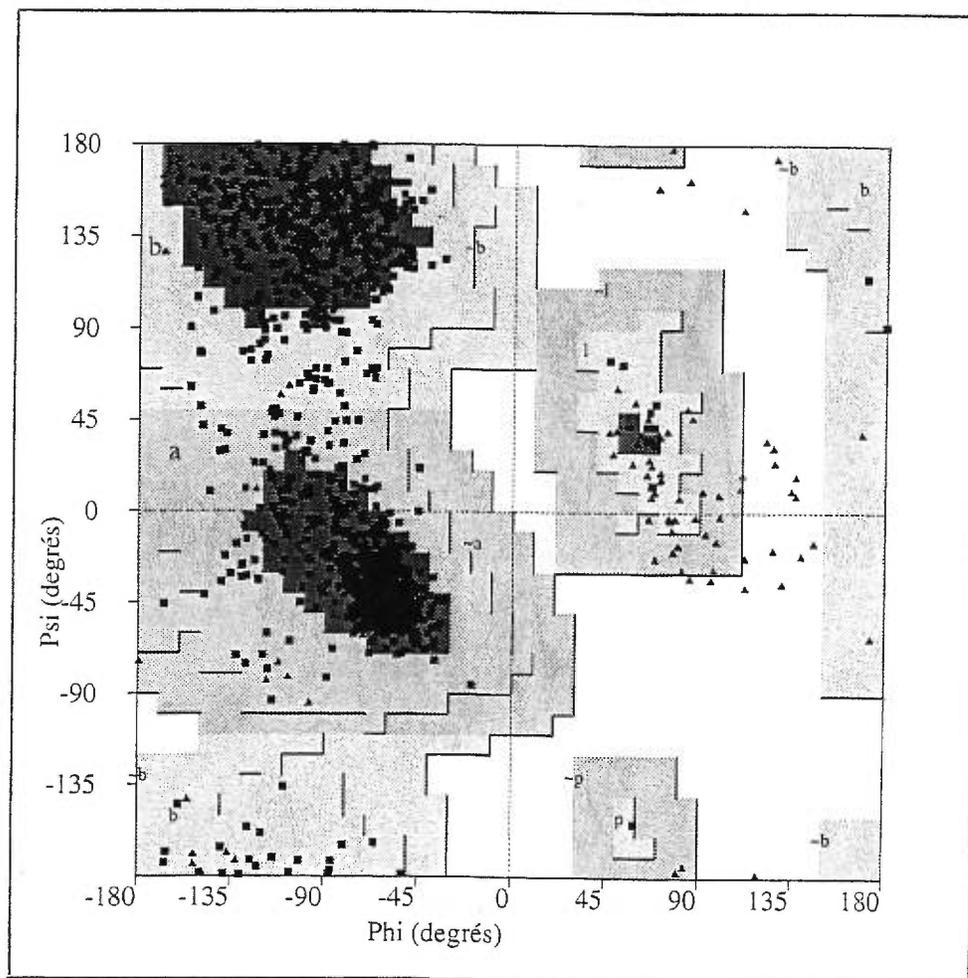


Figure 34 : Diagramme de Ramachandran du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin.

Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille a, b, c (Å)	165.968 58.364 86.954
α, β, γ (°)	90, 103.164, 90
Maximale résolution (Å)	2.15
Nombre total de réflexions	88801
Nombre de réflexions uniques	56675
Completeness (%)	
2.25 – 12 Å	77
2.15 – 2.25 Å	71
*R _{sym} (%)	7.7
<hr/>	
Intervalle de résolution (Å)	10 - 2.2
Nombre de réflexions (F > 1σF)	55143
Nombre d'atomes	17409
Nombre de molécules d'eau	3498
**R _{fact}	17.78
***R _{free}	22.89
B _{moyen} (Å ²)	6.05
B _{C-terminale} (Å ²)	39
<hr/>	
r. m. s. Déviation / valeurs idéales	
r.m.s.d. des liaisons (Å)	0.011
r.m.s.d. angles de torsions (°)	1.812
r.m.s.d. angles dièdres (°)	22.1
r.m.s.d. angles impropres (°)	1.21
Ramachandran	
Résidus (Conformations non permises)	2
Résidus (Conformations tolérées)	7

Tableau XVII : Données cristallographiques de l'affinement du mutant E187A.

* $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} |F_o(hkl)| - |\overline{F_o}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_o(hkl)|}$, est le nombre des réflexions observables

** $R_{fact} = \frac{\sum_{hkl} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)||}{\sum_{hkl} |F_o(hkl)|}$.

*** $R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)||}{\sum_{hkl \in T} |F_o(hkl)|}$,

T est l'ensemble des données sélectionnées aléatoirement sur 8% total des données et il est utilisé tout le long de l'affinement.

r.m.s.d : déviation par rapport à la moyenne.

B_{moy} : facteur d'agitation thermique moyen des atomes (partie C-terminale exclue).

B_{C-terminale} : facteur d'agitation thermique des résidus (343-363).

"Completeness" : le pourcentage des données collectées qui sont complètes.

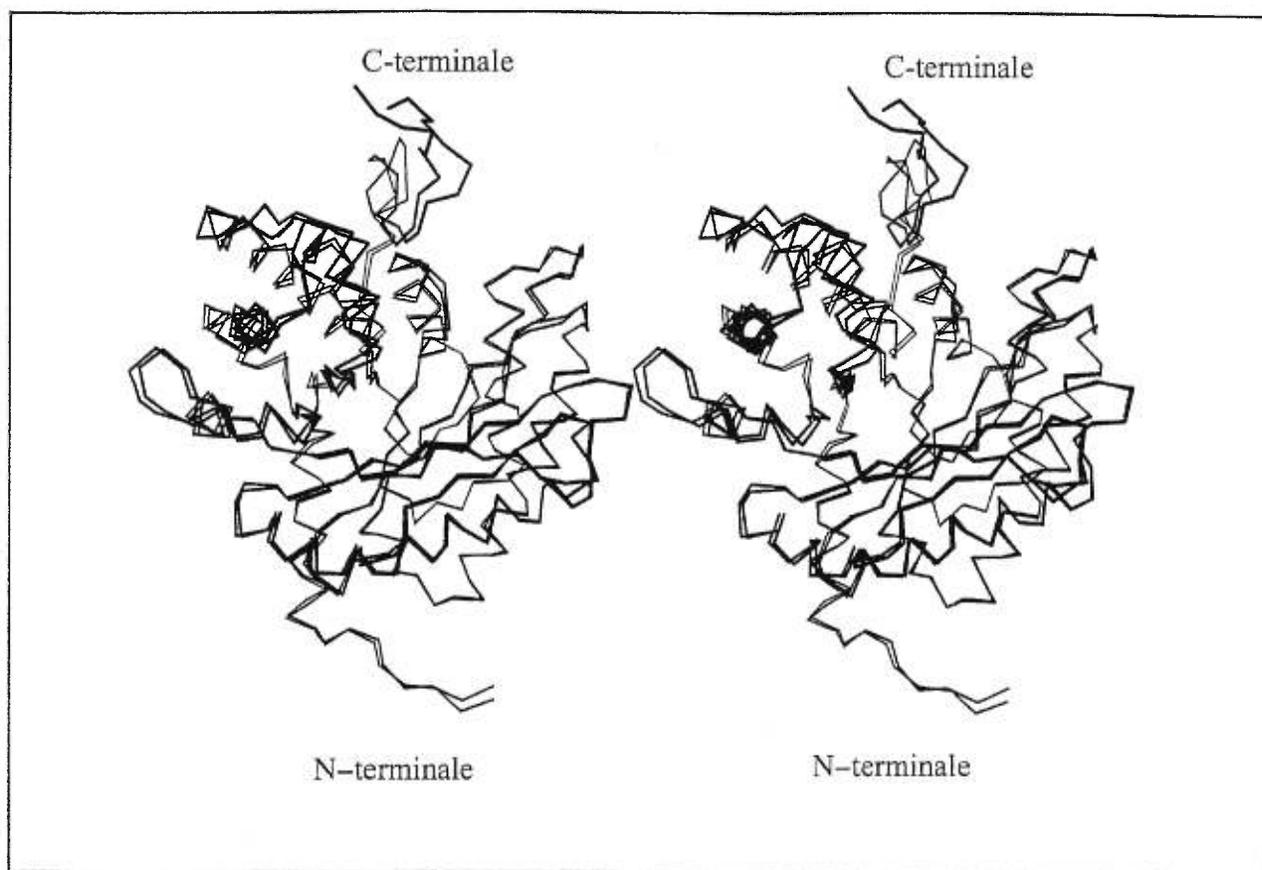


Figure 35 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_{α} de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et celle du mutant E187A.

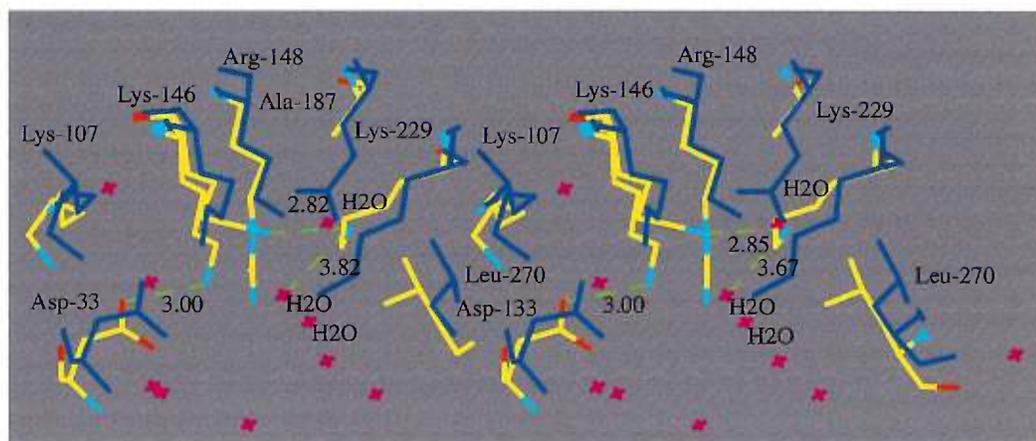
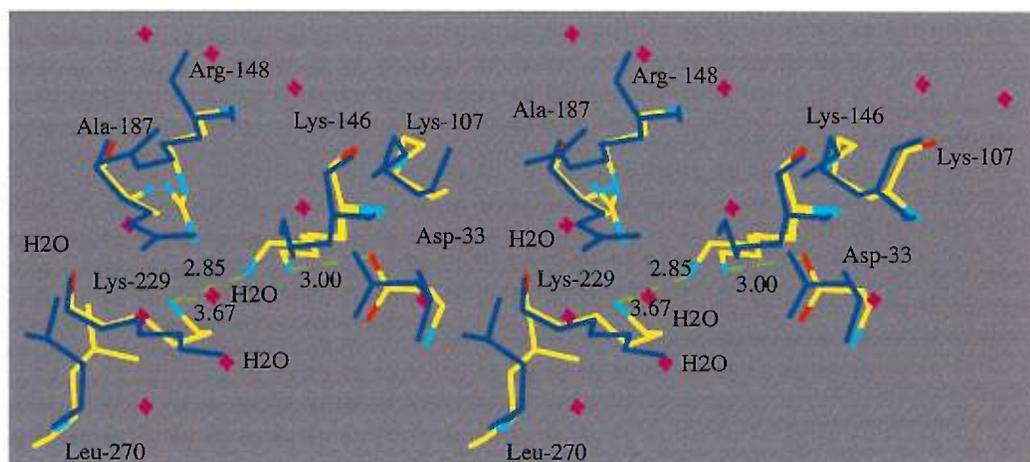


Figure 36 : Superposition du site actif de la sous-unité 1 (haut) et 2 (bas) du mutant E187A et de l'aldolase du muscle de lapin native (bleu).

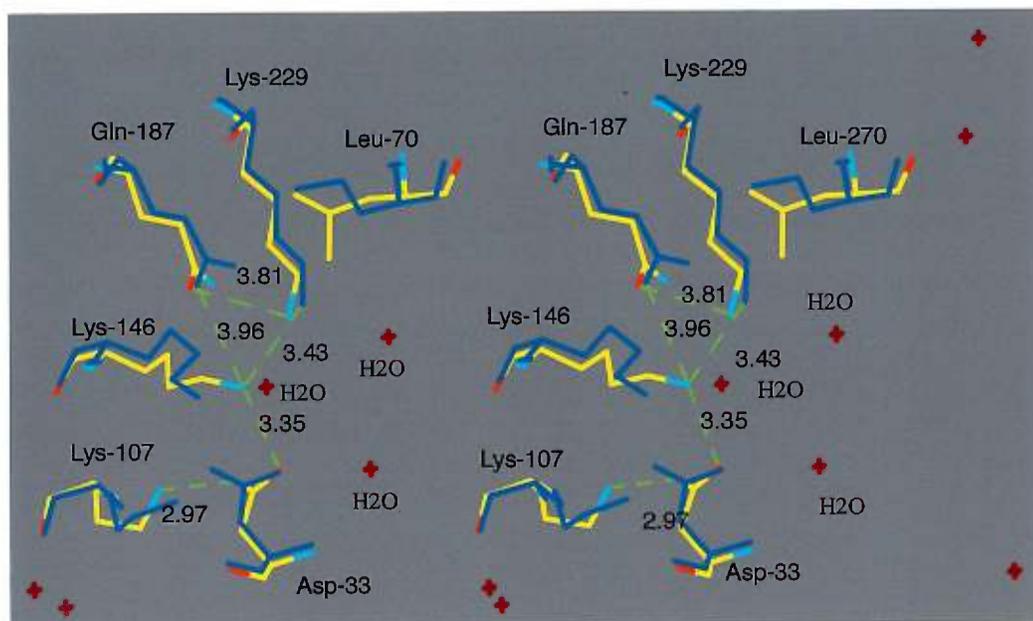
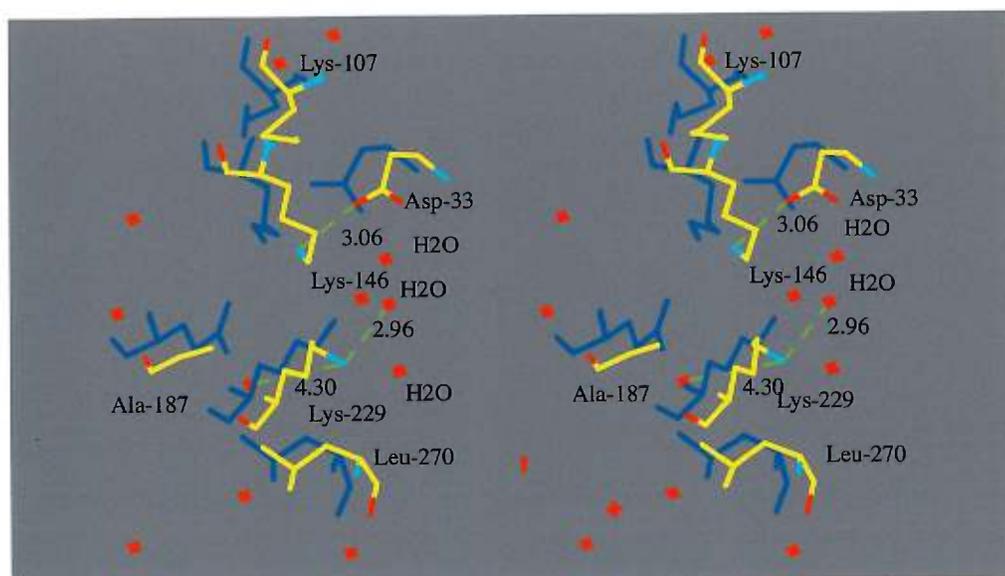


Figure 37 : Superposition des résidus du site actif de la sous-unité 3 et 4 du mutant E187A et de ceux de l'aldolase native (bleu)

3.8.4 Discussion

La comparaison de la structure tridimensionnelle de E187A et de celle de l'aldolase native montre que c'est le mutant qui a le plus subi de changements conformationnels non seulement au niveau de son site actif mais dans la totalité de sa structure comparativement aux mutants étudiés précédemment.

3.8.4.1 Hypothèse de Westheimer

L'analyse de la structure du mutant E187A nous permet de traiter les points soulevés par son comportement cinétique et de démontrer l'hypothèse de Westheimer d'une manière directe.

L'analyse des sites actifs montre un réarrangement différent suite à la mutation. La Val-150 et la Leu-270, suite aux changements des résidus avoisinants et principalement ceux de la Lys-229 et l'Arg-148, occupent l'espace créé par ces derniers. Ceci montre l'importance du maintien des interactions hydrophobes dans le "coeur" des protéines. Les lysines 229, 146 et 107 ont changé de conformations en direction de la cavité hydrophobe créée. Le rapprochement mutuel de la Lys-229 et de la Lys-146 induit un abaissement du pKa de l'une d'entre elle que suggère l'étude cinétique. Nous constatons que la Lys-146, qui avait une conformation avec une chaîne latérale compressée dans l'aldolase native due à la présence du DHAP, se relaxe dans E187A pour occuper l'espace libéré et possède deux conformations dans les sous-unités 1 et 2. L'environnement de la Lys-229, plus hydrophobe que chez l'enzyme native contribue à l'abaissement de son pKa et qui a été démontré par l'étude de la synthèse d'anticorps qui catalysent la réaction enzymatique de l'aldolase de classe I (Barbas et al., 1997).

La neutralité du Glu-187 implique le réarrangement des Lys-146 et 229 et la neutralité d'au moins l'une d'elle. Ce phénomène observé dans ce mutant éclaire un important aspect du mécanisme enzymatique de l'aldolase de classe I.

	SU1	SU2	SU3	SU4
Lys-229	3.67 Å Leu-270 2.85 Å Lys-146	2.82 Å Lys-146 3.29 Å 2804 H ₂ O(7.7)	2.96 Å 7177 H ₂ O(21) 3.11 Å 3579 H ₂ O(11)	(a) - (b) 2.72 Å Ser-300 3.43 Å Lys-146 3.23 Å 4381 H ₂ O(6)
Lys-146	(a) 2.85 Å Lys-229 2.68 Å 1695 H ₂ O(15) (b) 3 Å Asp-33 3.05 Å 1843 H ₂ O(2) 2.78 Å 1819 H ₂ O(9.4)	(a) 2.82 Å Lys-229 3.29 Å 2804 H ₂ O(7.7) (b) 3.95 Å Asp-10 3.03 Å Asp-33	3.06 Å Asp-33 3.15 Å 3950 H ₂ O(27.6) 3.09 Å 746 H ₂ O(23.6)	2.64 Å 85 H ₂ O(31) 3.35 Å Asp-33 3.43 Å Lys-229
Lys-107	-	2.71 Å 2909 H ₂ O(2) 3.31 Å 2434 H ₂ O(15.7)	3.34 Å 3430 H ₂ O(2) 3.4 Å 3379 H ₂ O(3.6) 3.3 Å 746 H ₂ O(23.6)	2.64 Å 85 H ₂ O(31)
Ala-187	-	-	-	-
Glu-189	2.91 Å 1945H ₂ O(8.8) 3.17 Å 1747 H ₂ O(25) 3.36 Å Arg-148	3.04 Å Arg-148 2.93 Å 2732 H ₂ O(3.3) 3.02 Å 2804 H ₂ O(7.7)	2.69 Å Arg-148 2.69 Å 3582 H ₂ O(20.7) 2.84 Å 3969 H ₂ O(28.35)	3.0 Å Arg-148 3.12 Å 4779 H ₂ O(7.2)
Arg-148	2.94 Å 1747 H ₂ O(25) 3.36 Å Glu-189	3.04 Å Glu-189 2.74 Å 2520 H ₂ O(9.72)	2.69 Å Glu-189	3.1 Å 4961 H ₂ O(24.3) 2.55 Å 8266 H ₂ O(28.63) 3 Å Glu-189
Asp-109	2.8 Å 1588 H ₂ O(25) 3.0 Å Lys-146	- 3.03 Å Lys-146	2.97 Å 738 H ₂ O(2) 3.06 Å Lys-146	3.07 Å 4985 H ₂ O(6.2) 2.81 Å 4473 H ₂ O(2)
Asp-33	3.04 Å 1783 H ₂ O(2) 3.18 Å 1843 H ₂ O(2)	3.03 Å Lys-146	3.12 Å 3401 H ₂ O(20) 2.91 Å 746 H ₂ O(19) 3.06 Å Lys-146	3.15 Å 4961 H ₂ O(24.2) 3.35 Å Lys-146

Tableau XVIII: Interactions des acides aminés du site actif du mutant E187A de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses. Avec a et b correspondant chacune à une conformation multiple.

Le tableau XVII montre les interactions entre les acides aminés du site actif ainsi qu'avec les molécules d'eau dans les quatre sous-unités du tétramère du mutant E187A. L'analyse de la solvation et des interactions entre les résidus du site actif montre que la Lys-146 est la plus solvatée (Tableau XVIII). Si on veut classer en terme de solvation et d'interactions les trois lysines du site actif, la Lys-146 vient en premier suivie de la Lys-229 puis de la Lys-107. Sachant que les pKa cités précédemment des lysines 146 et 107 sont aux alentours de 8.5 et 7.2, la Lys-229 devait avoir un pKa situé entre ces deux valeurs.

3.8.4.2 Molécule d'eau catalytique

L'analyse des deux sous-unités 1 et 2 montre que la cavité créée par la mutation contient une molécule d'eau qui joue le rôle du carboxylate du Glu-187 muté et dont la présence est aussi justifiée par la valeur supérieure de l'activité de E187A par rapport à E187Q dans D₂O (Article1, annexe1). Dans la sous-unité 1 et 2 cette molécule d'eau est située proche du résidu Glu-189 (Figure 38). Dans la sous-unité 3 et 4 cette molécule d'eau est située loin de la cavité à cause de l'encombrement stérique créée par les résidus voisins (Figure 38). Le mutant E187A stabilise moins l'ion immonium, mais augmente la vitesse de sa formation (Blonski et al., 1997). Cette molécule d'eau, suite à sa position dans le site actif est capable de transférer un hydrogène à l'ion immonium. Ce transfert est réalisé par le Glu-187 chez l'aldolase native. Cependant cette molécule d'eau ne peut stabiliser cet intermédiaire réactionnel de la même manière que le groupement carboxyle du Glu-187. La densité électronique correspondant à cette dernière, montre son interaction avec l'Arg-148 et le Glu-189.

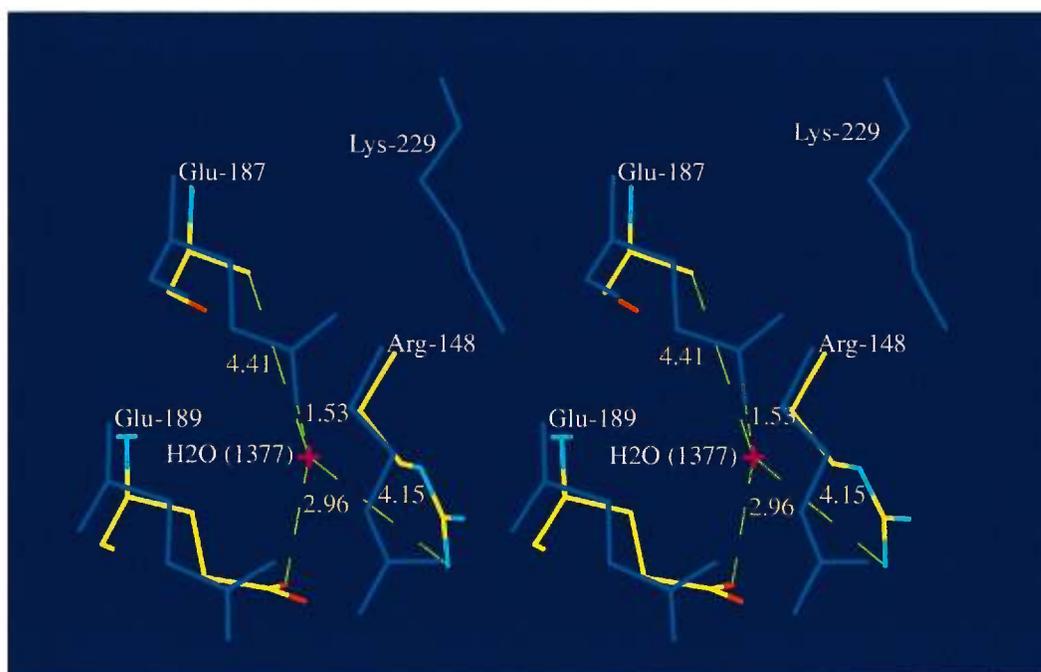


Figure 38 : Densité électronique correspondant à la molécule d'eau (1377) dans la cavité créée par la mutation du Glu-187 en alanine dans la sous-unité 1 du mutant E187A de l'aldolase du muscle de lapin.

3.8.4.3 Site de liaison du DHAP

L'espace qu'occupe le DHAP chez l'aldolase native est comblé par des molécules d'eau chez le mutant E187A. Il entraîne la présence de nouvelles molécules d'eau dans le site actif. L'absence du DHAP dans le site actif de ce mutant est principalement liée à l'absence de plusieurs facteurs qui contribuent à sa stabilité. Il y a d'abord l'effet direct de la mutation du Glu-187 en alanine qui ne peut plus stabiliser le OH du DHAP dans la conformation A. Ensuite vient l'effet des changements de conformation des résidus du site actif dû à la mutation. Ces résidus ne peuvent plus interagir avec le DHAP de la même manière que chez l'aldolase native. On constate que les conformations A et B du DHAP ne peuvent être stabilisées dans aucune des sous-unités et principalement à cause des déplacements des résidus (Ser-271, Ser300 et Gly-273) qui stabilisent le groupement phosphate du DHAP et à l'encombrement stérique créé par la Ileu-270 dans certaines sous-unités (Tableau XIX). Il est donc important que tous les résidus qui forment le passage permettant au DHAP d'aller vers le site actif puissent interagir avec lui. Quant à la stabilisation de la conformation C du DHAP, en plus d'être affectée par les changements des résidus cités ci-dessus, elle est aussi sensible aux changements conformationnels de l'Arg-303. En effet, ces interactions et principalement celles avec la boucle formée par les résidus de 270 à 274, permettent à ces résidus de stabiliser de la conformation C du DHAP. Notons que la stabilisation de la conformation C est nécessaire puisqu'elle précède l'étape B lors de l'acheminement du DHAP vers l'intérieur du site actif. La stabilisation de la conformation B est également nécessaire puisque, à son tour, elle conduit à la conformation A du DHAP. Notons une remarque importante, concernant l'Arg-303 et 42. Ces deux arginines même si elles jouent un rôle dans la stabilisation du DHAP, elles ne peuvent en aucun cas bloquer le passage du DHAP qui reste accessible dans toutes les sous-unités.

Mutant E187A	A	B	C
Sous-unité 1	Leu-270 [#] Lys-146 [#] Lys-229* Ser-271*	Ser-271 [#] Arg-303* Leu-270 [#]	Ser-271*
Sous-unité 2	Lys-146 [#] Ser-271*	Résidus (270-273) [#] Ser-271 [#]	Ser-271 [#]
Sous-unité 3	Lys-229* Ser-271*	Ser-271 [#]	Arg-303*
Sous-unité 4	Lys-229 [#] Ser-271*	Ser-271 [#]	Arg-303*

Tableau XIX : Les résidus dont le changement conformationnel chez le mutant E187A déstabilise le site A, B ou C du DHAP par encombrement stérique ([#]) ou par perte de liaison hydrogène (*).

3.8.4.4 Partie C-terminale

La partie C-terminale, dont la densité est clairement définie, est différente uniquement dans les deux premières sous-unités. Suite à la création et à la perte des interactions entre résidus, la partie C-terminale change sa trajectoire. La partie C-terminale dans la sous-unité 1 suit approximativement la même direction que la native. Il semble y avoir un léger éloignement de cette partie de la surface de la structure puis un retour plus accentué vers les résidus finaux. C'est dans la sous-unité 2 que la partie C-terminale varie le plus. Elle a subi une translation vers l'intérieur du site actif avec un déplacement de C_{α} de 4.8 Å. Ce phénomène a été également observé dans la même direction (4.9 Å) chez le mutant E187Q.

3.8.4.5 Site de liaison de l'ion SO_4^{2-}

L'ion SO_4^{2-} joue un rôle structural chez l'aldolase native parce qu'il interagit entre deux domaines et dans les sous-unités 3 et 4, il remplace le groupement COOH de la tyrosine C-terminale qui se lie à l'Arg-258. Il possède deux sites, le premier se trouve entre le domaine 2 et 3 et le second entre le domaine 1 et 4. Les résidus qui interagissent avec l'ion sulfate sont cités dans le tableau XX. Notons que contrairement à l'aldolase native, la structure 3D du mutant E187A ne possède pas d'ions SO_4^{2-} . Ceci est dû au changement d'orientation des résidus interagissant avec l'ion SO_4^{2-} et principalement ceux de la Lys-199 et de la Lys-12. Dans la sous-unité 1, la Lys-12 a changé l'orientation de sa chaîne latérale (Figure 39). Dans la sous-unité 2, la chaîne latérale de la lys-199 se dirige dans le sens opposé par rapport à sa position initiale dans l'aldolase native et subit un déplacement de 4.7 Å de son carbone C_{α} (Figure 40). La stabilisation de cet ion nécessite donc la présence simultanée de ces quatre résidus. La mutation de l'Arg-258 montre une faible diminution de l'activité de l'enzyme indiquant que le site du sulfate n'a que peu d'effet sur la catalyse de l'aldolase.

L'analyse du site de fixation du sulfate montre trois résultats. Le premier est la nécessité de tous les partenaires qui stabilisent l'ion sulfate pour sa présence. Ce résultat

montre que l'absence d'une liaison hydrogène dans le site de fixation de l'ion sulfate déstabilise cet ion et engendre sa déstabilisation, donc son absence. Cet effet n'est autre qu'un exemple structural qui montre qu'un ligand nécessite l'interaction de tous les partenaires pour être stabilisé. Il révèle également que les molécules d'eau ne peuvent substituer la perte d'une liaison hydrogène d'un résidu avec le ligand.

Le second point est l'effet structurale causé par cette mutation à longue distance. En effet, la mutation du glutamate en alanine engendre la création d'une cavité dans le site actif et implique un changement conformationnel dans toute la structure qui se répercute jusqu'à la surface de ses sous-unités. Ceci implique la modification des interactions entre résidus et plus précisément de ceux du site actif qui engendrent des changements de ceux situés à la surface de l'aldolases. Ces résidus, ne peuvent stabiliser l'ion sulfate comme cela est le cas chez l'aldolase native. Ce mutant révèle donc une nouvelle caractéristique de la famille des aldolase de classe I et qui se résume en la capacité de transmettre un changement de l'intérieur du site actif vers la surface de la protéine.

Le troisième point montre que chez le mutant E187A, l'ion sulfate n'est absolument pas nécessaire à la stabilité du regroupement oligomérique en tétramère de l'aldolase.

Interface du domaine 2	Interface du domaine 4
SU4: Arg-258 (NH _{1,2} , Nz) avec les oxyanions de l'ion sulfate OH, O ₃ et O ₄	SU3 : Arg-258 (NH _{1,2}) avec les oxyanions de l'ion sulfate O ₄ et O ₃
Lys-199 (N _z) avec l'oxyanion O ₄	Gln-202 (N _ε) avec le groupement OH
Gln-202 (N _ε) avec le groupement (OH)	Lys-199 (N _z) avec l'oxyanion O ₄
SU1 : Lys-12 (N _ε) avec les oxyanions O ₄ et O ₃	SU2 : Lys-12 (N _ε) avec les oxyanions O ₄ et O ₃
H ₂ O avec l'oxyanion O ₁	H ₂ O avec l'oxyanion O ₁

Tableau XX : Les interactions entre les résidus et les oxyanions O₁, O₃ et O₄ ainsi que le groupement hydroxyle de l'ion sulfate dans ces deux sites de fixation chez l'aldolase native

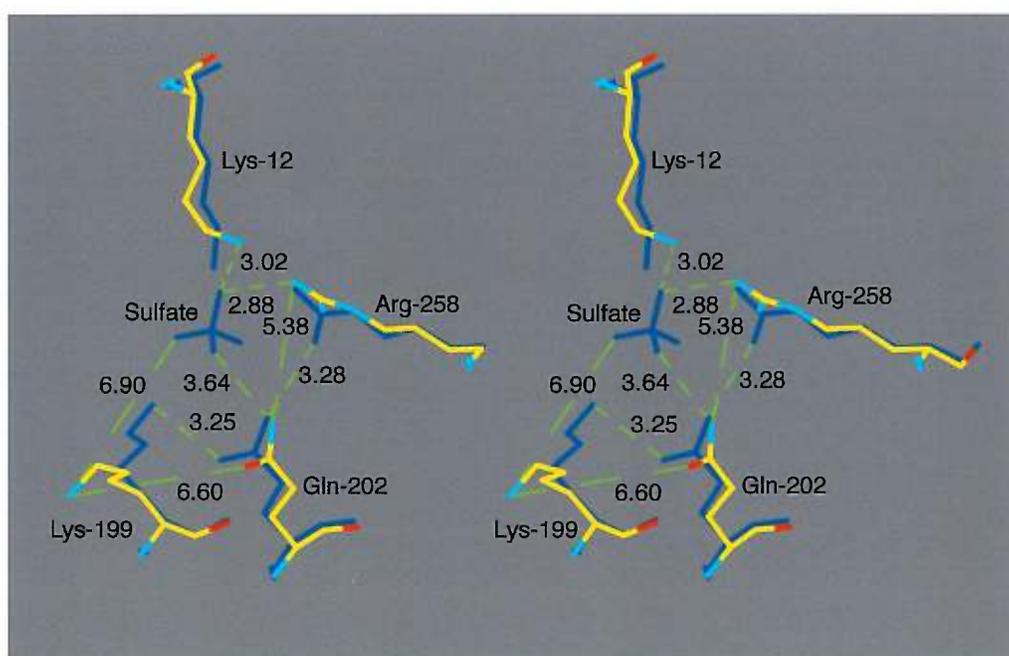


Figure 39 : Les différentes conformations adoptées par les résidus du mutant E187A et les résidus qui interagissent avec l'ion sulfate dans le site 1 chez l'aldolase du muscle de lapin (bleu).

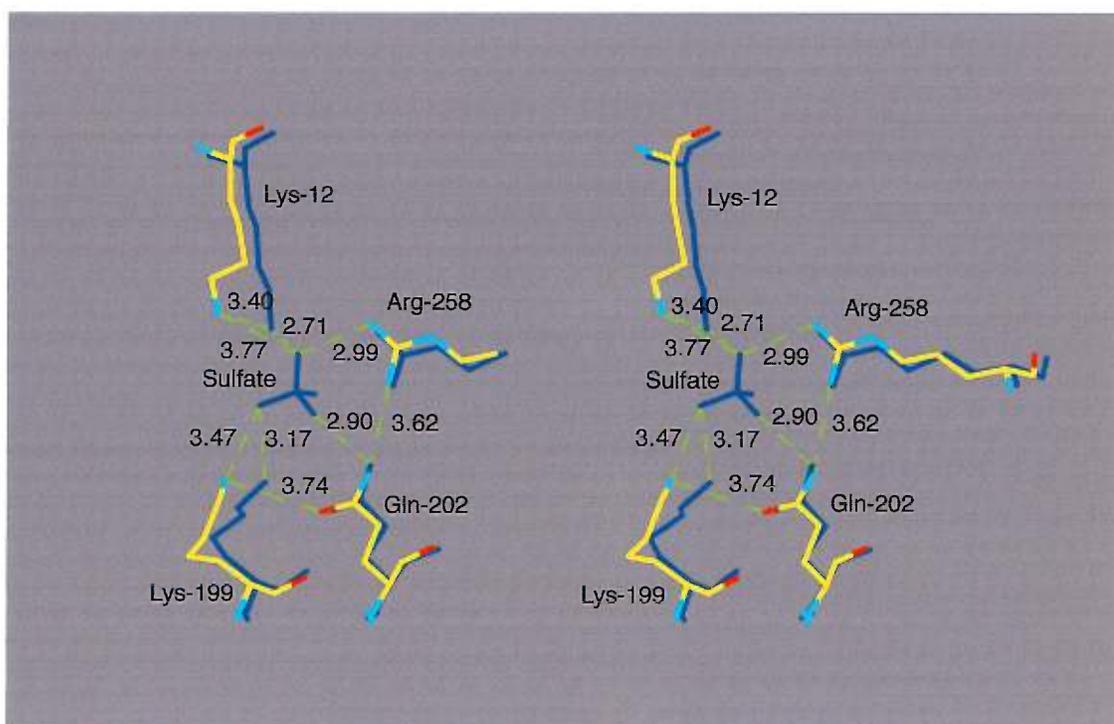


Figure 40 : Les différentes conformations adoptées par les résidus du mutant E187A et les résidus qui interagissent avec l'ion sulfate dans le site 2 chez l'aldolase du muscle de lapin (bleu).

L'étude du mutant E187A nous a permis de vérifier l'effet de la neutralisation du Glu-187 sur les deux lysines 229 et 146 à savoir l'hypothèse de Westheimer (Westheimer., 1995). Cependant afin d'apporter plus d'explication concernant le comportement cinétique de E187A et E187Q ainsi que sur l'implication du Glu-187 dans l'échange de proton avec l'énamine, l'étude structurale de E187Q décrite dans le paragraphe qui suit s'est avérée nécessaire.

3.9 Étude de la structure tridimensionnelle du mutant E187Q

3.9.1 Introduction

Comme cela a été cité précédemment, la position du Glu-187 entre la Lys-229 et la Lys-146 dans le site actif, lui permet d'être impliqué certainement dans des étapes de la catalyse. En effet, l'étude de la cinétique enzymatique a révélé son implication dans la catalyse mais a difficilement pu interpréter son rôle uniquement grâce à ces données. L'éclaircissement quant au rôle de ce résidu dans l'activité catalytique ne peut être envisagé que par une étude structurale du mutant E187Q.

Nous avons montré dans la section de l'étude cinétique que ce mutant, E187Q isostérique, possède une activité spécifique A_s mille fois plus faible que celle de l'aldolase native ($A_s = 0.0065$ U/mg). Cette activité est mesurable aux pH acides et diminue d'un facteur cinq aux pH basiques (Figure 21). Nous observons le même profil pour la variation en fonction du pH de la constante de Michaelis Menten, K_m . La variation du facteur k_{cat}/K_m montre la présence d'une courbe en forme de double cloche qui est aussi observée chez les mutants E187A et E187D (Demoissac et al., 1995). Elle correspond à quatre états d'ionisation différents de l'enzyme et/ou du substrat nécessaire à la formation du complexe.

L'étude par cinétique d'échange isotopique décrite précédemment, a montré que le rôle du Glu-187 serait plus au niveau de la déshydratation de la carbinolamine ou dans le clivage de la liaison C₃-C₄ du DHAP qu'au niveau de l'échange de l'hydrogène de l'énamine avec le solvant.

Les données structurales du mutant E187Q sont susceptibles de nous informer d'avantage quant à la relation structure/fonction du site actif de l'aldolase native et de ce mutant. Celle-ci permettra d'analyser l'effet de la mutation du groupement carboxylate du Glu-187 normalement chargé au pH de cristallisation en carboxylamine neutre sur la conformation et par conséquent sur l'état de charge des résidus du site actif. Les connaissances acquises par le biais de cette étude vont compléter celles obtenues à partir du mutant E187A. L'étude structurale de E187Q va contribuer à déterminer le mode et les partenaires avec lesquels ce résidu peut effectuer les transferts de protons lors de la formation des intermédiaires de la réaction enzymatique (carbinolamine, immonium, énamine). L'analyse de l'ensemble des résultats nous permet de mettre en évidence les nouvelles caractéristiques de l'aldolase.

3.9.2 Résolution et affinement de la structure 3D du mutant E187Q

Le mutant E187Q, purifié selon le protocole cité précédemment, est étudié grâce à des mesures de diffusion en solution (DLS) à une concentration de 2 mg/ml dans 100 mM TEA à pH 7.4. Cette expérience permet de vérifier sa mono-dispersion et de mesurer sa masse moléculaire (160 ± 10 kD). Les données de diffraction obtenues à 2 Å à partir des cristaux de E187Q dans le sulfate d'ammonium sont utilisées pour la résolution de sa structure cristallographique selon le protocole décrit dans la section 2.6. Le mutant E187Q possède la même structure tétramérique et le repliement en forme de tonneau α/β . Ce mutant a été analysé et comparé à l'aldolase native aussi bien au niveau des structures quaternaires qu'au niveau atomique. Les valeurs finales obtenues à la suite de plusieurs cycles d'affinement sont représentées dans le tableau XXI. La variation du R_{free} et R_{fact} au cours des différentes étapes d'affinement montre la convergence de l'affinement. Le diagramme de Ramachandran est représenté à la figure 41.

Cette étude structurale se base principalement sur la comparaison des résidus qui jouent un rôle dans le mécanisme catalytique (site actif) et ceux qui sont impliqués dans la stabilité conformationnelle de l'enzyme (C-terminale, ion sulfate,...). Cette analyse

comparative entre les deux structures va déterminer les différents types de modifications qui ont lieu suite à la mutation aussi bien dans les chaînes principales que latérales de certains acides aminés. Nous constatons que le nombre final de molécules d'eau est comparable à celui de l'aldolase native étant donné que leur résolution est semblable. Cependant, pour les autres mutants, ce nombre varie et dépend de la haute résolution du cristal.

Les changements conformationnels observés dans E187Q affectent différentes sortes d'interactions qui sont principalement des liaisons hydrogènes, de Van Der Waals et électrostatiques. Ces changements sont la principale cause de la différence entre le comportement cinétique du mutant E187Q et celui de l'aldolase native. Ces interactions se répercutent même sur le repliement au niveau de sa partie C-terminale. Cette partie est devenue plus compacte que celle de l'aldolase native grâce à son repliement en hélice pour certaines parties (voir plus loin). L'une des principales caractéristiques de E187Q est qu'il ne possède pas, contrairement à l'aldolase native, de molécule de DHAP dans son site actif. L'étude structurale portera donc principalement sur les critères qui gèrent la fixation du DHAP d'une manière non covalente ainsi que sur l'impact des changements conformationnels subis par les résidus impliqués dans la liaison du DHAP.

3.9.3 Analyse de la structure 3D du mutant E187Q

Les données de diffraction à 2 Å du mutant E187Q sont utilisées pour la résolution de sa structure cristallographique selon le protocole décrit dans la section 3.7. Le mutant E187Q garde la même structure tétramérique et possède le même repliement en forme de tonneau α/β . Ce mutant, est analysé et comparé à l'aldolase native aussi bien au niveau des structures quaternaires qu'au niveau atomique.

Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille a, b, c (Å)	164.32 , 57.51 , 85.36
α, β, γ (°)	90, 102.66, 90
Maximale résolution (Å)	2
Nombre total de réflexions	88143
Nombre de réflexions uniques	81034
Completeness (%)	
2.02-12 Å	86
2-2.02 Å	83
*R _{sym} (%)	13
<hr/>	
Intervalle de résolution (Å)	12 - 2
Nombre de réflexions (F > 1σF)	13592
Nombre d'atomes	17126
Nombre de molécules d'eau	3519
**R _{fact}	23.35
***R _{free}	19.31
B _{moyen} (Å ²)	10.5
B _{C-terminale} (Å ²)	36
<hr/>	
r. m. s. Déviation / valeurs idéales	
r.m.s.d. des liaisons (Å)	0.009
r.m.s.d. angles de torsions (°)	1.748
r.m.s.d. angles dièdres (°)	21.512
r.m.s.d angles impropres (°)	1.517
Ramachandran	
Conformations non permises	1
Conformations tolérées	1

Tableau XXI : Données cristallographiques de l'affinement du mutant E187Q.

* $R_{sym} = \frac{\sum \sum_i |F_i(hkl)| - |\bar{F}_i(hkl)|}{\sum \sum_i |F_i(hkl)|}$, est le nombre des réflexions observables.

** $R_{fact} = \frac{\sum_{hkl} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_o(hkl)|}$.

*** $R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|}{\sum_{hkl \in T} |F_o(hkl)|}$,

T est l'ensemble des données sélectionnées aléatoirement sur 8% total des données et utilisé tout le long de l'affinement ; "Completeness" : le pourcentage des données collectées qui sont complètes ; r.m.s d : déviation par rapport à la moyenne.

B_{moy} : facteur d'agitation thermique moyen des atomes (partie C-terminale exclue).

B_{C-terminale} : facteur d'agitation thermique des résidus (343-363).

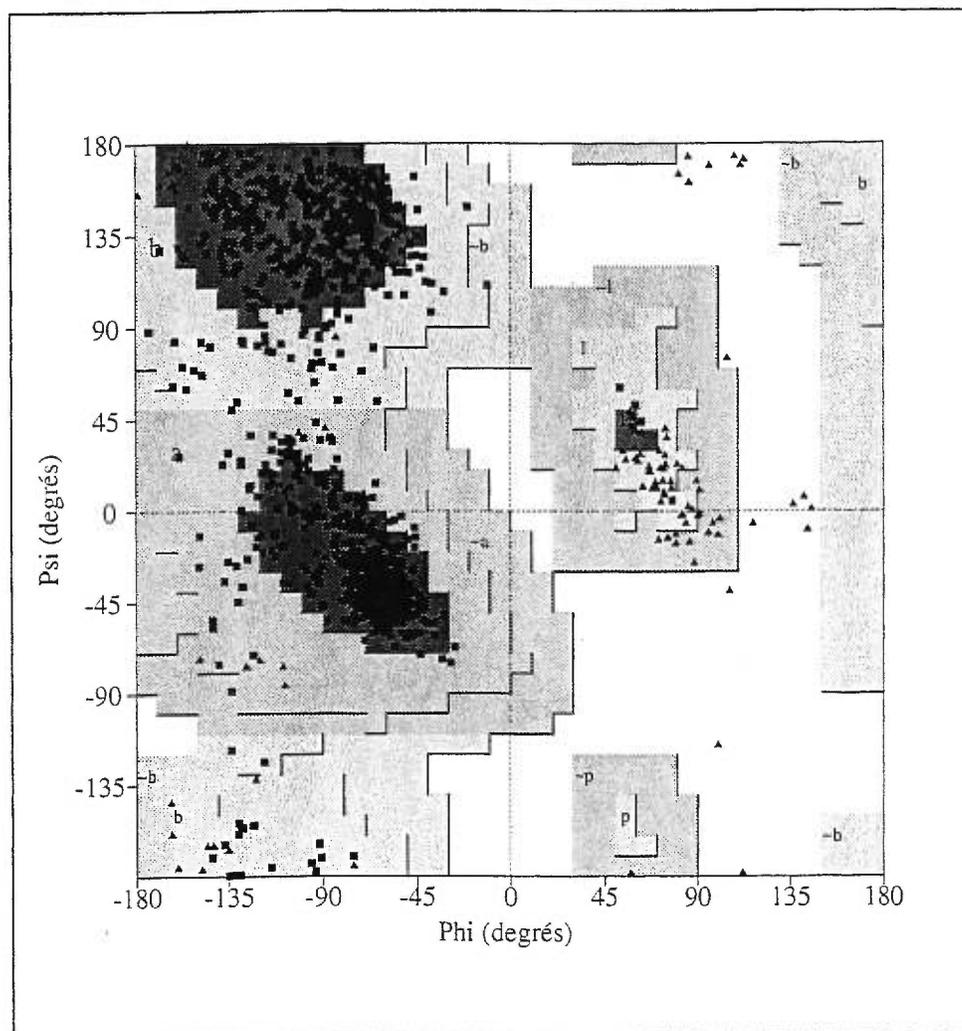


Figure 41 : Diagramme de Ramachandran du mutant E187Q de l'aldolase de muscle de lapin.

La comparaison de la structure de l'aldolase native et du mutant E187Q révèle une variation entre les C_{α} du tétramère de 0.2 Å en moyenne, la partie C-terminale formée par les résidus 344 à 363 étant exclue. Cette partie est caractérisée par une importante flexibilité et diffère d'une sous-unité à l'autre. Par contre la variation des C_{α} de la partie C-terminale est seulement de 0.7 Å par rapport à celle de l'aldolase native (Figure 42). L'analyse de chaque monomère montre que globalement, la structure a subi peu de changements conformationnels. Les seules variations observées sont au niveau des chaînes latérales de certains résidus du site actif, de ceux qui forment l'accès au site actif (Glu-34, Arg-42, Arg-303, Glu-354) et de ceux de la partie C-terminale (344-363). L'analyse de ces changements dans chacune de ces sous-unités est traitée ci-dessous.

Sous-unité 1. Dans le site actif de cette sous-unité, les principaux résidus qui ont subi des changements conformationnels sont le Glu-189, la Lys-146 et l'Asp-33. La chaîne latérale du Glu-189 s'est rapprochée de celle du Gln-187 de 0.88 Å. La distance entre le Gln-187 (NH_2) et le Glu-189 ($O\epsilon_2$) est de 2.95 Å au lieu de 3.97 Å dans l'aldolase native en plus, elle est stabilisée par une liaison hydrogène. Nous constatons que, suite à la neutralisation de la charge du résidu 187, le Gln-187 ($N\epsilon_2$) s'éloigne de la Lys-146 (N_2) de 3.85 Å au lieu de 3.15 Å chez l'aldolase native. Quant à la Lys-229, elle fait partie des résidus qui n'ont pas subi de changements majeurs (Figure 43).

A l'entrée du site actif, la principale différence observée est le rapprochement de l'Arg-303 et 42 qui étant antiparallèles et distantes de 5.6 Å dans l'aldolase native, se sont rapprochées à une distance de 3.6 Å, sans toutefois changer de directions. L'Arg-303 se dirige plus vers l'Arg-42 grâce à une rotation de $\sim 60^\circ$ autour de $C_{\alpha} - C_{\beta}$, tandis que dans la sous-unité 2, elle subit une rotation de $\sim 66^\circ$ autour de la liaison $C_{\gamma} - C_{\delta}$. L'Arg-303 a perdu son lien ionique avec le Glu-345 en raison de l'éloignement mutuel dans deux directions

opposées de leur chaînes latérales de 2.3 et 6 Å respectivement. Le Glu-354 chez l'aldolase native avait sa chaîne latérale insérée entre celles des deux arginines 42 et 303, ce qui facilitait leur rapprochement. Dans E187Q, l'Arg-303 prend la place occupée par le Glu-354 chez l'aldolase native et se trouve ainsi à proximité de la chaîne principale de la Gly-273. La conformation de l'Arg-303 ainsi que le déplacement de la chaîne principale de la Ser-271 ne permet pas à ces deux résidus de stabiliser le DHAP ce qui défavorise sa présence dans le site actif.

La comparaison des structures secondaires de l'aldolase native et du mutant E187Q montre que les hélices, formées par les résidus de 35 à 49 et 316 à 327, ont subi un déplacement parallèle à leurs axes de 0.3 Å et 0.5Å respectivement. Ces deux hélices se trouvent à proximité de la partie C-terminale et sont distantes de 9 Å. Elles forment les parois du canal qui mène jusqu'au site actif. En effet, même si le déplacement global de ces hélices est faible, les résidus qui les forment ont subi beaucoup de changements conformationnels qui influencent énormément leur interaction avec la partie C-terminale. L'hélice (316-327), grâce à l'interaction entre la Lys-311 avec la Ser-355 et l'Ala-351, rapproche la partie C-terminale de la surface de la protéine. L'abolition de cette interaction dans E187Q aboutit à l'éloignement de la partie C-terminale et principalement de la boucle formée par les résidus 347 à 354 qui se déplace de 7.6 Å par rapport à la surface de la protéine. Nous constatons également l'absence de l'interaction entre le Glu-325 et la Lys-68 et celle de l'Arg-330 et le Glu-277. D'autres résidus à la surface de la protéine, dont la Lys-317 et 321 qui ont des interactions uniquement avec des molécules d'eau présentes ont moins de contraintes conformationnelles et changent plus facilement de conformations que les résidus à l'intérieur de la protéine.

La partie C-terminale, formée des résidus 343 à 363, a une densité électronique entièrement interprétable grâce à la localisation de sa nouvelle conformation. La réorganisation conformationnelle de cette partie n'étant pas définie dans le modèle initial, a nécessité que chaque résidu soit placé dans la densité électronique qui lui correspond et corrigé par modélisation lors des cycles d'affinement. Cette partie possède des différences

locales par rapport à celle de l'aldolase native à partir de la Pro-344 jusqu'à la Tyr-363. Malgré ces changements, cette partie finit au même endroit grâce à la Tyr-363 qui maintient son interaction avec la Lys-43. Cette partie se trouve plus en retrait du site actif comparativement à celle de l'aldolase native et même si elle reste toujours proche des résidus de la surface du monomère, elle a différentes interactions avec eux. Elle subit des changements majeurs à partir de la Ser-345 où la partie formée des résidus 345 à 354 s'éloigne de 7 Å de la surface de la protéine.

Sous-unité 2. Le site actif de cette sous-unité est le siège de modifications conformationnelles des résidus qui restent tout de même proches de celle de l'enzyme native. La chaîne latérale du Glu-189 est la seule qui présente un changement notable et se rapproche du Gln-187. Le groupement O_{e_2} du Glu-189 se rapproche à une distance de 2.87 Å du N_{e_2} du Gln-187. Le groupement ϵ -ammonium de la Lys-146 s'éloigne faiblement du N_{e_2} du Gln-187 à une distance qui, de 3.36 Å chez l'aldolase native, devient égale à 3.85 Å dans ce cas-ci. Le Gln-187 muté, implique des faibles changements conformationnels des résidus Lys-146 et Asp-33 (Figure 43). A l'entrée du site actif, les chaînes latérales des deux Arg-42 et 303 ont légèrement varié. Elles restent anti-parallèles et gardent leur interaction avec le Glu-34 et 345 respectivement. L'Arg-303 s'oriente plus vers l'extérieur du site actif et se rapproche plus de l'Arg-42 qui, elle, se dirige vers l'intérieur du site actif. La partie C-terminale subit des changements conformationnels à partir du résidu 359 et suit un chemin différent de celui de l'aldolase native et des autres sous-unités du tétramère. Ces différences évaluées en distance varient de 1.2 à 5 Å. Ces changements, même s'ils ont eu lieu, laissent intacts les interactions ioniques dont la stabilité est reliée à leur conservation. Malgré les variations observées chez les résidus de la partie C-terminale, certaines interactions sont conservées et jouent probablement un rôle important dans la stabilité de l'enzyme. C'est le cas de l'interaction de la Tyr-363 avec l' ϵ -ammonium de la Lys-42 qui se conserve, bien que leurs positions et orientations mutuelles aient changé. Nous constatons aussi la conservation de l'interaction de la Lys-311 avec la chaîne latérale ($O\gamma$) de la Ser-353 qui a probablement un impact structural important.

Sous-unité 3. Le site actif dans cette sous-unité est similaire à celui de l'aldolase native. Les résidus qui ont subi le plus de changements conformationnels sont le Glu-189, la Lys-146 et la Leu-270. La chaîne latérale du Glu-189 a subi une translation qui la rapproche du Gln-187 muté à une distance qui, de 3.83 Å chez l'aldolase native devient égale à 3.01 Å dans ce cas-ci. La Lys-146 a subi un faible déplacement de sa chaîne latérale en direction de celle de l'Asp-33. Elle s'éloigne ainsi de 0.4 Å de celle du Gln-187 situé à une distance de 3.89 Å. La Leu-270 subit une rotation de sa chaîne latérale pour occuper l'espace libéré par le Glu-189 et se rapproche plus vers le trio Lys-229, Gln-187 et Glu-189, qui lui sont perpendiculaires (Figure 44). Concernant les résidus situés à l'entrée du site actif, seule l'Arg-303 a subi une rotation de sa chaîne latérale vers l'extérieur avec son carbone C ϵ et son groupement amine dirigé perpendiculairement à l'entrée du site. La conformation de la partie C-terminale reste similaire à celle de l'aldolase native. Cette partie a de faibles fluctuations, elle est stable, à l'exception des résidus compris entre 342 et 357 qui sont plus exposés au solvant et ont un facteur B_{moyen} plus élevé (Tableau XXI).

Sous-unité 4. Les changements conformationnels dans son site actif touchent essentiellement les trois résidus soient le Glu-189, la Lys-107 et la Lys-146. Le Glu-189 se rapproche à une distance de 3.11 Å du Gln-187, au lieu de 3.89 Å chez l'aldolase native. La Lys-107 ne préserve que son interaction avec le groupement (COOH) de l'Asn-33 ce qui provoque son éloignement du carbonyle de sa chaîne principale. La Lys-146 a subi un changement conformationnel qui aboutit à son rapprochement de 0.4 Å de l'Asn-33 et de 2.93 Å de la Lys-229. La distance entre ces deux lysines induit la formation d'une liaison hydrogène entre leur groupement ϵ -ammonium et implique la neutralité d'au moins l'une d'elle. La Lys-229 est proche de la Ser-300 et possède un environnement quasi hydrophobe est probablement celle qui est neutre. La partie C-terminale et les deux arginines Arg-303 et 42 n'ont pas subi de changement majeur. Ces deux résidus présentent la même conformation et la même orientation que dans l'aldolase native, c'est-à-dire vers l'intérieur et l'extérieur respectivement du site actif. L'Arg-303 se dirige plus vers l'extérieur tout en restant proche de la Gly-273.

	SU1	SU2	SU3	SU4
Lys-229	3.15 Å 1952 H ₂ O(32) 2.83 Å Ser-300	3 Å Ser-300	2.94 Å Ser-300 2.78 Å 3977 H ₂ O(15)	3.19 Å Ser-300 2.94 Å Lys-146
Lys-146	2.5 Å 1493 H ₂ O(16) 3.17 Å 1952 H ₂ O(32) 2.97 Å Asp-33	3.15 Å 686 H ₂ O(22) 2.73 Å 2616 H ₂ O(10) 2.94 Å Asp-33	2.89 Å 3977 H ₂ O(15) 2.61 Å 7342 H ₂ O(31) 2.87 Å Asp-33	3.35 Å Asp-33 2.94 Å Lys-229
Lys-107	2.78 Å 1806 H ₂ O(27)	2.76 Å Asp-33 2.75 Å 2694 H ₂ O(32)	3.06 Å 3892 H ₂ O(32)	2.97 Å Asp-33
Gln-187	2.95 Å Glu-189	3.17 Å 2641 H ₂ O(9.9) 2.82 Å Glu-189	3.08 Å Glu-189	3.18 Å Glu-189
Glu-189	3.7 Å 1847 H ₂ O(10) 2.78 Å 1576 H ₂ O(2) 2.95 Å Glu-189	2.94 Å Arg-148	3.08 Å Gln-187 3.02 Å Arg-148	3.18 Å Gln-187 2.8 Å 4967 H ₂ O(32)
Arg-148	3.14 Å 1645 H ₂ O(45) 2.7 Å Glu-189	2.84 Å 6119 H ₂ O(54) 3.34 Å 2649 H ₂ O(13) 2.94 Å Glu-189	3.02 Å Glu-189 2.69 Å 3653 H ₂ O(36)	2.67 Å 4659 H ₂ O(31)
Asp-109	3.09 Å 1977 H ₂ O(44) 2.95 Å 1961 H ₂ O(2.8)	3.07 Å 686 H ₂ O(22) 2.73 Å 6118 H ₂ O(31)	2.72 Å 3813 H ₂ O(8) 2.8 Å 3472 H ₂ O(28)	2.98 Å 4963 H ₂ O(8)
Asp-33	2.8 Å 1493 H ₂ O(16.8) 2.97 Lys-146	2.94 Å Lys-146 2.76 Å Lys-107	2.87 Å Lys-146	3.35 Å Lys-146 3.18 Å Ileu-77

Tableau XXII : Interactions des acides aminés du site actif du mutant E187Q de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses.

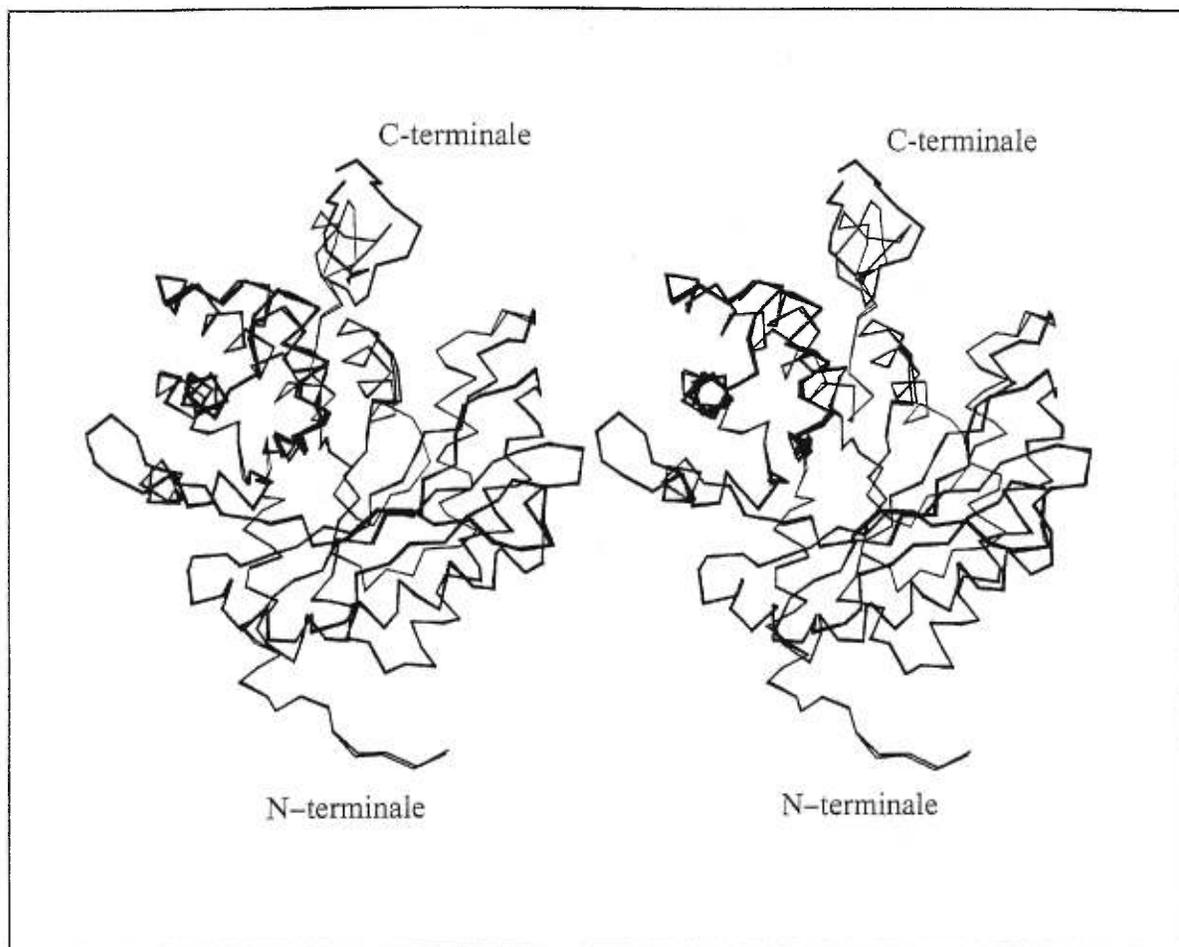


Figure 42 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_{α} de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et celle du mutant E187Q.

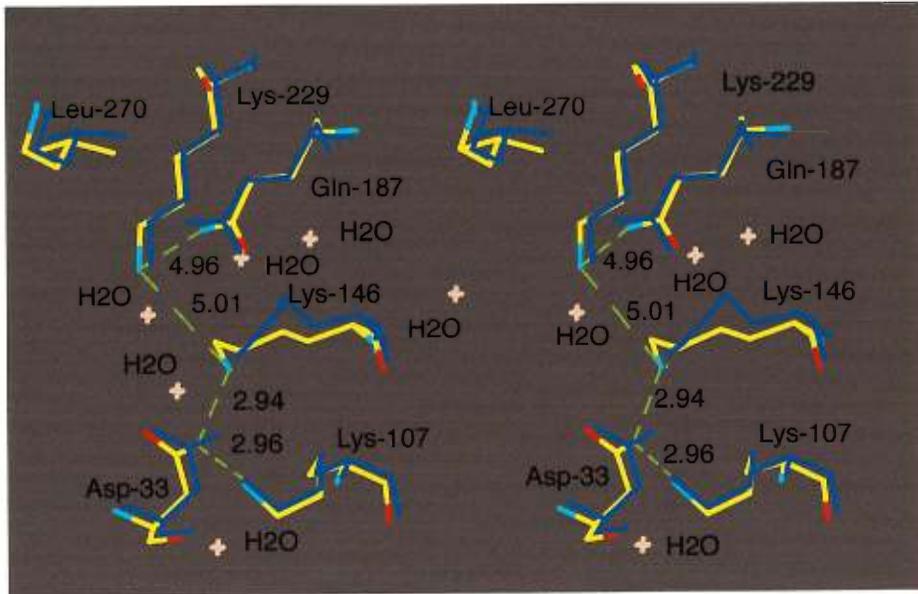
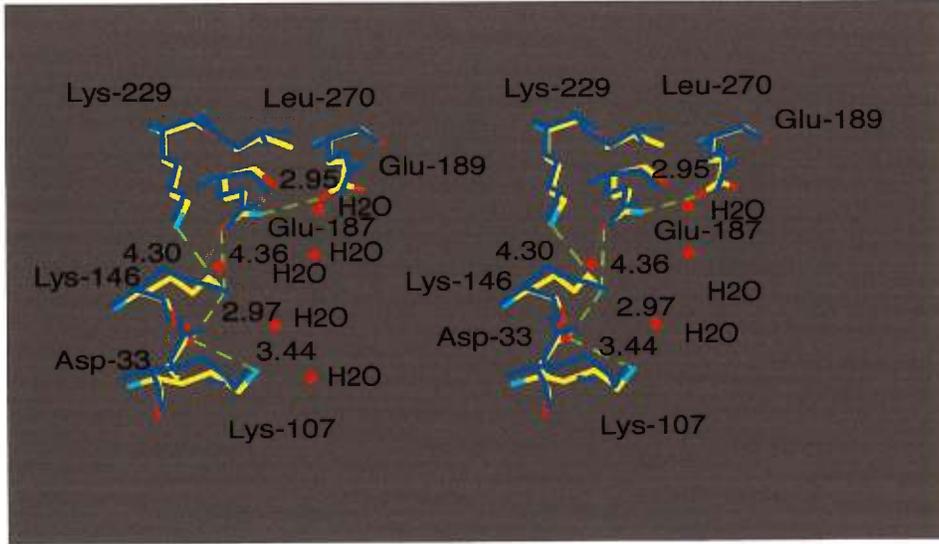


Figure 43 : Superposition du site actif de la sous-unité 1 (haut) et 2 (bas) du mutant E187Q et de l'aldolase du muscle de lapin native (bleu).

3.9.4 Discussion

Dans cette section, nous allons traiter trois résultats importants. Dans un premier temps, nous allons déterminer l'état de charge et la fonction de certains résidus du site actif et principalement celui du Glu-187 et de la Lys-229. Ensuite, nous allons analyser les facteurs qui gèrent la fixation du DHAP d'une manière non covalente dans le site actif. Finalement, nous allons discuter des liens qui existent entre la mutation ponctuelle du Glu-187 en Glutamine et des changements structuraux de la partie C-terminale.

L'effet de la mutation isostérique du résidu 187 montre que celle-ci a plusieurs impacts sur la structure de E187Q. Ces changements conformationnels sont beaucoup plus accentués dans les sous-unités 1 et 2 comparativement aux sous-unités 3 et 4. La modélisation et l'analyse comparative de E187Q (obtenu par la même procédure de purification et de cristallisation que l'aldolase native), nous amènent à poser plusieurs questions concernant l'état ionique du Glu-187, de la Lys-229 et de l'Asp-33 chez l'aldolase native.

3.9.4.1 Hypothèse de Westheimer

Dans la sous-unité 2, la Lys-229 interagit uniquement avec la Ser-300 sans aucun autre partenaire (ni acides aminés, ni molécule d'eau). Les interactions qu'établit cette lysine avec les résidus voisins représentent un argument convaincant de la neutralité de la Lys-229 chez le mutant E187Q (Tableau XXII). Or, le fait que cette lysine ait subi peu de changements par rapport à l'aldolase native et qu'en plus d'avoir un environnement hydrophobe elle interagit avec le carbone C₂ du DHAP dans la sous-unité 1 (Blom et Sygusch., 1997), suppose que cette lysine est également neutre chez l'aldolase de type sauvage.

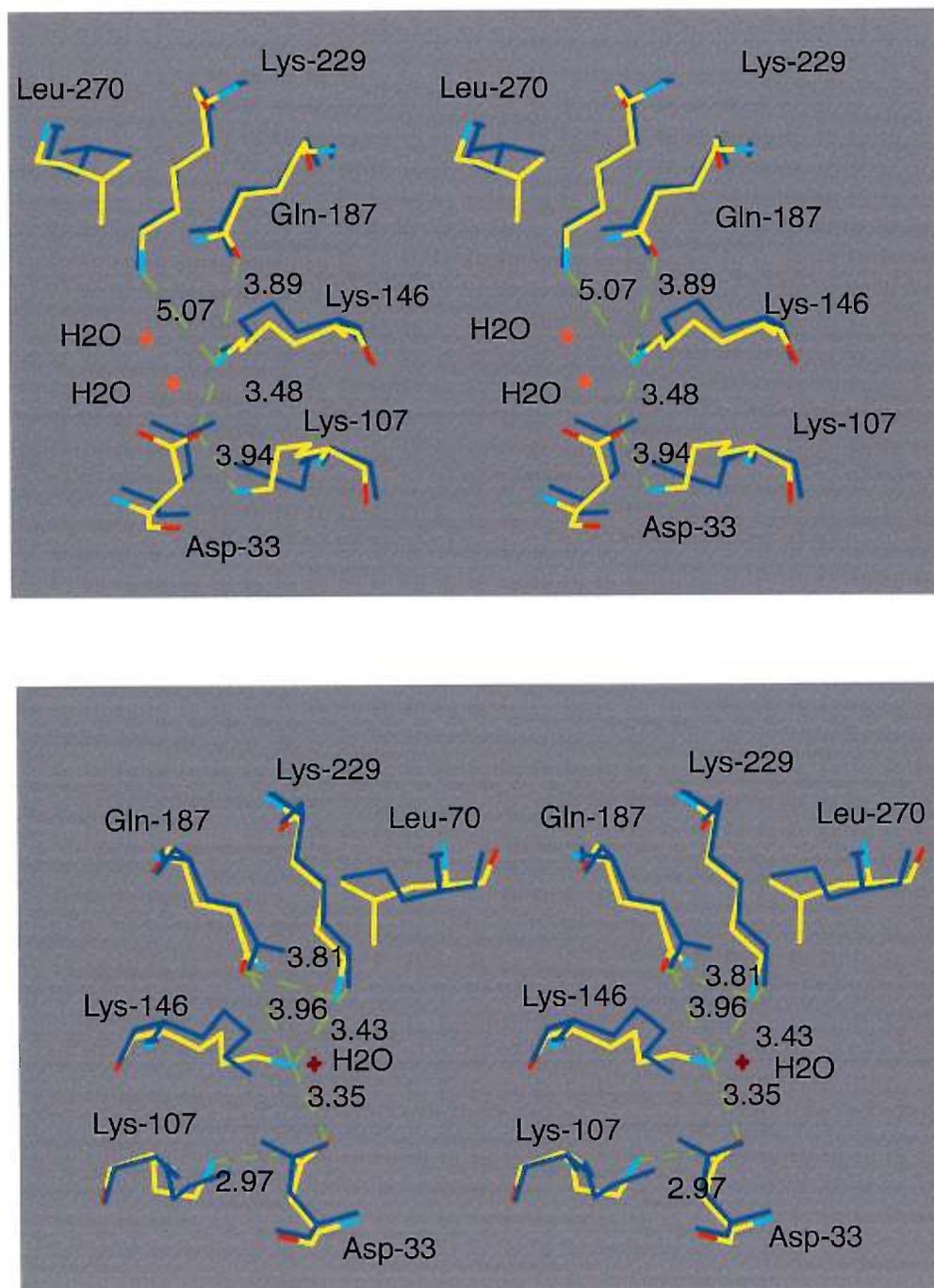


Figure 44 : Superposition du site actif de la sous-unité 3 (haut) et 4 (bas) du mutant E187Q et de l'aldolase du muscle de lapin native (bleu).

L'hypothèse de neutralité de la Lys-229 chez l'aldolase de type sauvage qui diminue sa sensibilité vis-à-vis de la neutralisation du groupement fonctionnel du Glu-187 muté en Gln-187 est montré par la présente analyse structurale. En effet, la mutation du Glu-187, n'influence guère la conformation de la Lys-229. L'état neutre de la Lys-229 se concorde avec sa position éloignée par rapport au Glu-187 (4.2 Å). Le Glu-187 que l'on montrera être chargé négativement dans la suite ne peut que stabiliser une charge positive voisine. La neutralité de la Lys-229, nécessaire à l'attaque nucléophile sur le carbonyle du substrat de l'aldolase, peut donc être un état ionique pré-acquis et non provoqué au moment de la catalyse par un quelconque transfert de proton entre cette lysine et une molécule d'eau ou avec le résidu anionique le plus proche, soit le Glu-187. Dans les sous-unités 3 et 4, la rotation de la Leu-270 en direction de la Lys-229 et du Gln-187 augmente l'hydrophobicité de cette partie du site actif et contribue au déplacement du pKa de la Lys-229 vers les pH acides. Ce dernier est d'ailleurs clairement démontré dans la sous-unité 4 où il y a formation d'une liaison hydrogène entre la Lys-229 et la Lys-146. Ce rapprochement implique la diminution du pKa de la Lys-229 selon l'hypothèse de Westheimer préalablement montrée dans le cas de l'acétoacétate décarboxylase et qui révèle que le rapprochement de deux groupement ϵ -ammonium de deux lysines du site actif (Lys-115 et 116) induit la diminution du pKa de celle qui forme la base de Schiff (Lys-116) avec le substrat. Le mutant E187Q nous apporte une seconde preuve qui confirme la diminution du pKa de la Lys-229. Cette diminution de pKa de la Lys-229 résultant du rapprochement des deux lysines 146 et 229 a été montrée pour la première fois d'une manière structurale dans le cas des protéines dont la catalyse se fait via la formation d'une base de Schiff avec le substrat.

Si la Lys-229 n'a pas changé de conformation, la chaîne latérale de la Lys-146 quant à elle adopte des positions différentes dans chacune des quatre sous-unités. Cette lysine, située à mi-chemin entre le Glu-187 et l'Asp-33, elle perd l'interaction ionique avec le Glu-187 muté. La Lys-146 se rapproche donc plus vers son autre partenaire l'Asp-33. Le Gln-187 est un résidu qui peut établir une liaison hydrogène, mais ne peut établir de liaison ionique. Il est donc délaissé par la Lys-146.

La Lys-146 est chargée positivement jusqu'au pH 8.5. Ce résultat émane de l'analyse de la solvation dans le site actif des quatre sous-unités du tétramère du mutant E187Q. L'état de charge de cette lysine est aussi appuyé par son interaction avec l'Asp-33 (Tableau XXII).

3.9.4.2 État de charge du résidu Glu-187

La liaison hydrogène entre la Lys-146, l'Asp-33 montre que chez l'aldolase native cette interaction entre ces deux résidus leur donne l'avantage d'avoir un important impact sur la stabilisation des intermédiaires réactionnels et principalement dans le cas de l'énamine (section 3.3). Quant au Glu-187, il est situé plus loin de la Lys-146 que ne l'est l'Asp-33, à une distance de 3.4 Å dans la sous-unité 1 et à une distance encore plus grande dans les autres sous-unités. Le Glu-187 ne peut avoir de liaison hydrogène avec la Lys-146 et étant donné qu'il est chargé négativement, il pourrait participer à la catalyse en arrachant facilement un proton au carbone C₄ du substrat FBP.

Le Glu-189 constitue le seul résidu dont la chaîne latérale se rapproche de celle du Gln-187. La distance entre ces résidus leur permet de former une liaison hydrogène (Figure 45). Il est difficile de connaître l'emplacement du groupement NH₂ par rapport au groupement O_e du carboxylamine du Gln-187 à partir de la densité électronique. Quant à l'énergie des deux conformations elle est équivalente. En effet, l'affinement de la structure du mutant E187Q avec l'une des deux conformations du Gln-187, aboutit au même facteur R_{free} et à la même valeur d'énergie du mutant E187Q. Les interactions entre la chaîne latérale du Gln-187 et les résidus voisins sont favorables à l'existence des deux conformations. Ces résultats ont aussi été vérifiés dans les quatre sous-unités.

La chaîne latérale du Gln-187 a un environnement plus hydrophobe que celui du Glu-187 puisqu'elle présente moins d'interactions avec des molécules d'eau. Suite à la mutation, les faibles changements structuraux qui affectent cette partie du site actif ne sont pas impliqués dans la diminution de solvation du Gln-187. La diminution de solvation

observée aux alentours du Gln-187 est liée à sa chaîne latérale qui est plus hydrophobe que celle du Glu-187. En effet la constante d'hydrophobicité du groupement CONH₂ est de -1.49 tandis que celle du groupement COOH et COO⁻ est de -0.32 et -4.36 respectivement (Creighton., 1984). Il est donc clair que, chez l'aldolase native, la chaîne latérale du Glu-187 est chargée négativement, ce qui facilite probablement son rôle dans la catalyse. Le rapprochement du Glu-189 du Gln-187 muté dans les différentes sous-unités est dû à l'état neutre de la chaîne latérale du Gln-187 muté et se résume dans le tableau XXIII. On remarque que même si ce rapprochement est plus important dans les sous-unités 1 et 2 que dans 3 et 4, il est présent dans les quatres sous-unités.

Sous-unité	Aldolase native	E187Q
	*d(Glu-187, Glu-189) (Å)	**d(Gln-187, Glu-189) (Å)
1	3.97	2.95
2	4.08	2.87
3	3.83	3.6
4	3.89	3.4

Tableau XXIII : Les distances entre les résidus 187 et 189 dans les deux structures, native et mutante, E187Q.

*d(Glu-187, Glu189) : distance entre la chaîne latérale des résidus Glu-187 et Glu-189

**d(Gln-187, Glu189) : distance entre la chaîne latérale des résidus Gln-187 et Gln-189

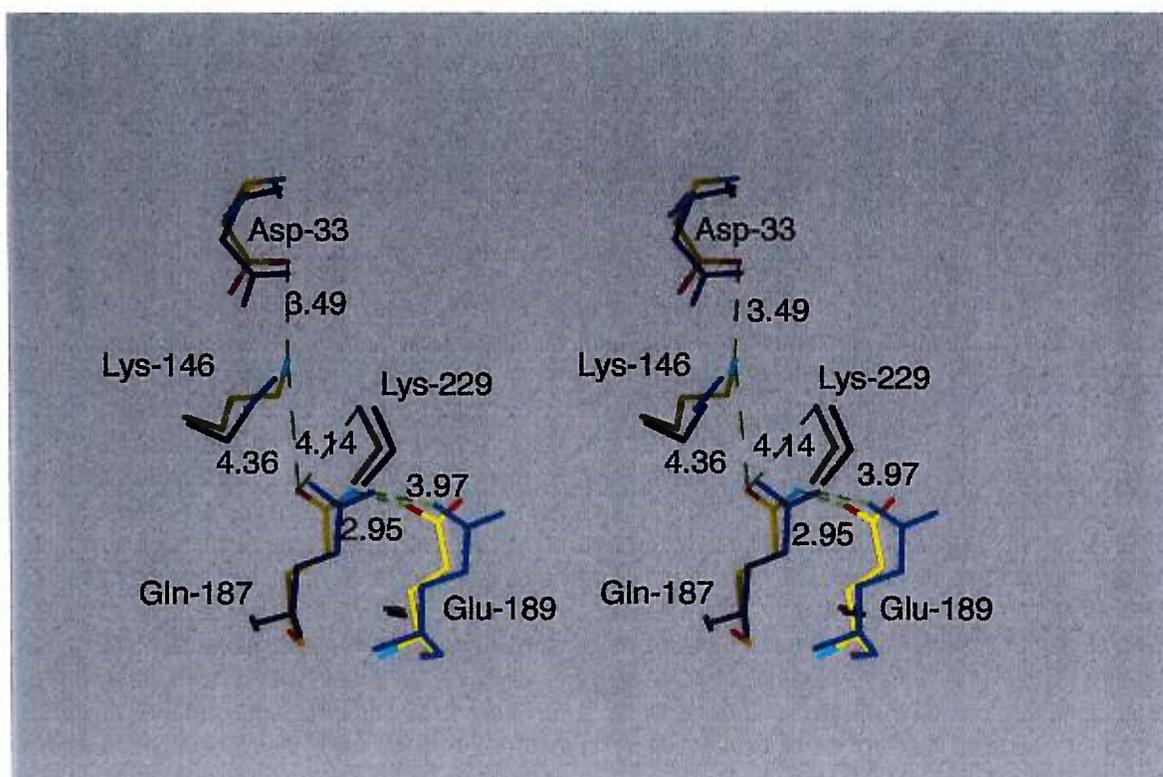


Figure 45 : Superposition du site actif de l'aldolase native (bleu) et du mutant E187Q montrant le rapprochement du Glu-189 du résidu muté Gln-187 chez E187Q.

Parmi les résidus du site actif qui ont subi un changement conformationnel on trouve la Lys-107 impliquée dans la liaison du phosphate en C₆ du substrat FBP chez l'aldolase du foie humain (Blom et Sygusch, non publié). La chaîne latérale de ce résidu s'est éloignée du groupement carbonyle de l'Asp-33 par une rotation de 180° de son N₂ et devient proche uniquement du groupement carboxyle de la chaîne latérale de cette aspartate. La réorientation de la Lys-107 vers l'extérieur du site actif contribue à maintenir le même état de charge dans le site actif. En effet, la neutralisation du groupement carboxylate (Glu-187) par la mutation aboutit à l'éloignement du groupement ε-ammonium de la Lys-107 du site actif et donc au changement de son pKa. En effet, il a été montré grâce à la liaison du chromophore PLP avec la Lys-107, que le pKa de cette lysine est de 10.2 chez le mutant E187Q au lieu de 7.2 chez l'enzyme de type sauvage (Sygusch., non publié). La valeur élevée du pKa de cette lysine, facilite son interaction avec le groupement phosphate en C₆ du substrat FBP.

3.9.4.3 Site de liaison du DHAP

Le deuxième volet d'analyse qui émane de l'étude structurale des sites actifs du mutant E187Q montre que contrairement à la structure native, ce dernier ne lie pas de DHAP dans quelque sous-unité que ce soit. Ceci est attribuable à plusieurs raisons, qui sont liées soit à l'absence des interactions qui stabilisent le DHAP dans l'une de ces conformations A, B ou C, soit à l'encombrement stérique créé par la mutation. L'absence du DHAP est liée aux changements qui découlent directement de la mutation dans le site actif et dans la partie C-terminale.

L'absence du complexe Michaelis DHAP-Aldolase chez E187Q est attribuable à quatre raisons principales. La première est la déstabilisation de la molécule d'eau (1610) chez l'aldolase native, elle stabilise le DHAP et le Gln-187. En effet, même si l'interaction du Gln-187 muté peut encore stabiliser le groupement OH du carbone C₃ du DHAP, elle ne peut stabiliser cette molécule d'eau que si son groupement NH₂ est situé du côté du Glu-189. L'absence du DHAP est en faveur de l'orientation adoptée par la chaîne latérale du Gln-187 avec son groupement NH₂ du côté de la Lys-146 chez le mutant E187Q. La déstabilisation de

cette molécule d'eau est contributive à l'absence du DHAP dans la conformation A chez le mutant E187Q.

Dans les sous-unités 3 et 4, en plus des raisons citées ci-dessus, l'absence du DHAP est liée à l'encombrement stérique créé par la rotation de la chaîne latérale de la Leu-270 en direction de la Lys-229 et du Gln-187 qui empêchent le DHAP de se stabiliser dans la conformation A.

La troisième raison est liée principalement au changement conformationnel des résidus Gly-302 et Ser271 qui stabilisent le groupement phosphate du DHAP chez l'aldolase native. Le changement subi par ces résidus est relié à l'absence de la conformation B et A du DHAP.

Le dernier changement conformationnel qui affecte la stabilité des atomes du DHAP dans la conformation B et C est lié aux résidus se trouvant au niveau de l'accès du site actif (Arg-303, Arg-42, Gly-272). La Gly-272 change de position et déstabilise le site de liaison du phosphate du DHAP. Dans les sous-unités 1 et 2, les chaînes latérales des deux arginines 303 et 42 se sont éloignées et leurs nouvelles conformations ne leur permettent plus de stabiliser le site B du DHAP. Tandis que rapprochement de l'Arg-303 et de l'Arg-42 dans la sous-unité 3 et 4 ainsi que leur nouvelle position antiparallèle qui n'est pas favorable à la liaison du DHAP dans le site C (Tableau XXIV).

Protéine	$d_{SU1}(\text{Å})$	$d_{SU2}(\text{Å})$	$d_{SU3}(\text{Å})$	$d_{SU4}(\text{Å})$
E187Q	3.66	4.05	6.3	7.7
WT	7.47	3.1	5.45	8.1

Tableau XXIV : Distances entre les groupements ϵ -ammonium de la chaîne latérale de l'Arg-303 et celle de l'Arg-42 dans les 4 sous-unités du tetramère du mutant E187Q et de l'aldolase native (WT).

En plus du Glu-187 muté en Glutamate, la structure tridimensionnelle du mutant E187Q montre que la Ser-344 est en fait une proline. Cette seconde mutation s'est produite d'une manière spontanée chez l'aldolase native et non pas chez E187Q puisque la présence de ce résidu proline a été démontrée par la détermination de la séquence primaire de l'aldolase native et du mutant E187Q. Le mutant E187A et les deux autres mutants K229M et K107M qui seront analysés par la suite ont également une proline en position 344. Cette mutation c'est probablement produite lors de l'expression de l'enzyme recombinante native chez *E.coli*. Cette Pro-344 située au début de la partie C-terminale, possède la caractéristique intrinsèque de changer l'orientation des résidus qu'elle précède dans la séquence primaire. Dans les sous-unités 1 et 2 du mutant E187Q, elle oriente différemment la partie C-terminale et induit la modification de plusieurs interactions.

3.9.4.4 Partie C-terminale

La partie C-terminale dans ce mutant ne connaît d'importantes modifications par rapport à celles de l'aldolase native que dans les sous-unités 1 et 2. La structure montre un changement des partenaires et des interactions des résidus des hélices (35-49, 316-327). Ces résidus forment l'entrée du site actif et ont un impact important sur la partie C-terminale dont le facteur d'agitation moyen est de 36 \AA^2 . En effet, ces changements sont la principale cause du chemin inhabituel suivi par cette partie dans le mutant E187Q. Les changements subis par la partie C-terminale sont reliés avec ceux subis par les Arg-42 et 303 et donc à l'absence du DHAP dans les sous-unités 1 et 2.

3.9.4.5 Molécules d'eau

Une autre approche qui vise à analyser des molécules d'eau entre les structures native et mutante permet de déterminer le degré de similitude entre ces dernières et d'évaluer le rôle de ces molécules dans le site actif. Nous constatons que plusieurs molécules d'eau sont conservées entre les deux structures, principalement celles du site actif qui peuvent avoir un rôle non seulement structural mais aussi catalytique. A ce sujet, une étude détaillée est présentée aux paragraphes suivants.

L'un des aspects lié aux molécules d'eau, qui au début peut paraître banal mais dont l'interprétation nous apporte beaucoup d'informations, est l'analyse des interactions entre les résidus et les molécules d'eau chez l'aldolase native et mutante. Chez l'enzyme native, les Glu-187 et 189 sont parallèles et établissent chacun une liaison hydrogène avec une molécule d'eau. Suite à la mutation, la molécule d'eau qui est proche du Glu187 s'éloigne de celui-ci dans les sous-unités 1 et 2 et disparaît dans les sous-unités 3 et 4.

La structure du mutant E187Q, montre que ces molécules d'eau du site actif ont subi un déplacement moyen de 0.6 \AA et que plusieurs d'entre elles sont conservées. L'espace correspondant au DHAP dans la structure de l'aldolase native qui possède trois conformations, A et B dans la sous-unité 1, C dans la sous-unité 2, est occupé par cinq molécules d'eau. Ces molécules occupent la densité correspondant aux 2 conformations A et

B dans la sous-unité 1. Dans la sous-unité 2, seulement 3 molécules d'eau occupent la conformation C. L'arrivée du DHAP dans le site actif abouti au départ des molécules d'eau du site actif. La désolvatation du site actif qui est situé dans le cœur hydrophobe de l'aldolase est donc favorable.

Le modèle tridimensionnel du mutant E187Q a fourni des arguments qui contribuent à une meilleure compréhension de la structure et de la fonction catalytique de l'aldolase du muscle de lapin. L'analyse de E187Q suggère que, chez l'aldolase native, le Glu-187 est chargé négativement et qu'il intervient dans un transfert de proton avec la Lys-146 et avec les intermédiaires réactionnels et principalement lors de la formation de la carbinolamine. L'hypothèse de Westheimer est vérifiée dans la sous-unité 4 où la Lys-229 est neutre. Le mutant E187Q, nous fournit une preuve structurale supplémentaire à celle obtenue à partir du mutant E187A de cette hypothèse ainsi qu'une explication des interactions dans le site actif qui déclenchent le rapprochement des deux lysines 146 et 229.

Les connaissances acquises par le biais de cette analyse nous fournissent des explications concernant la conformation adoptée par la partie C-terminale ainsi que l'absence du DHAP dans le site actif de E187Q. La présence du DHAP chez l'aldolase native est liée à deux phénomènes, la conformation et l'état ionique des résidus qui le stabilisent. L'absence de l'un de ces deux facteurs explique donc la déstabilisation du DHAP. La partie C-terminale intervient dans la conformation de ces résidus et est étroitement impliquée dans la stabilisation du DHAP dans le site actif.

Le mutant E187Q possède deux ions sulfates dans des sites identiques à ceux de l'enzyme native. Ce mutant, contrairement au mutant E187A a plus de changement par rapport à l'enzyme native dans son site actif et sa partie C-terminale (résidus 344-363) que dans la totalité de sa structure.

Sites du DHAP			
	A	B	C
Sous-unité 1	Gln-187*	Ser-271 [#]	Gly-302*
Sous-unité 2	Gln-187*	Ser-271 [#]	Gly-302*
Sous-unité 3	Gln-187*	Leu-270 [#]	Résidus (270-272) [#] , Ser-271 [#]
Sous-unité 4	Gln-187*, Lys-229*	Leu-270 [#]	Résidus (270-272) [#] , Ser271 [#]

Tableau XXV : Les résidus dont le changement conformationnel chez le mutant E187Q déstabilise le site A, B ou C du DHAP par encombrement stérique ([#]) ou par perte de liaison hydrogène (*).

3.9.4.6. Relation structure-fonction chez le mutant E187A et E187Q

Les structures des deux mutants E187A et E187Q montrent plusieurs résultats importants sur le mécanisme enzymatique de l'aldolase de classe I et principalement concernant la neutralité de la Lys-229. En effet, le mutant E187Q ayant une structure similaire à celle de l'aldolase native, montre que le comportement cinétique observé chez ce mutant est lié à la mutation. On peut donc attribuer la similarité entre le nombre de bases de Schiff formé lors de l'aldolisation du DHAP chez l'aldolase native et le mutant E187Q au fait que la Lys-229 a été montrée être neutre au pH 7.4 de cristallisation chez E187Q et qu'elle l'est également chez l'enzyme de type sauvage. Donc la neutralité du Gln-187 n'a pas d'effet sur la Lys-229. Le comportement cinétique de ce mutant en fonction du pH, est dû à la neutralisation de la charge du Glu-187. Il est clair que si la mutation du Glu-187 en Gln-187 influence le pKa de la Lys-107 situé à 10 Å, elle affecte probablement celui de la base de Schiff qui est située aux environs de 4 Å seulement de sa chaîne latérale.

Chez le mutant E187A, les changements dans sa structure 3D sont importants et ont abouti à l'insertion d'une molécule d'eau qui à de sa position pourrait jouer un rôle dans le mécanisme catalytique. La présence de cette molécule d'eau catalytique dans la cavité créée par la mutation suggère que celle-ci est probablement impliquée dans l'activité de ce mutant. On remarque que dans D₂O les deux mutants E187A et E187Q ont une activité spécifique qui est similaire (annexe 1).

3.10 Étude structurale du mutant K107M de l'aldolase du muscle du lapin

3.10.1 Introduction

Lorsque l'aldolase interagit avec le pyridoxal 5'-phosphate (PLP), il y a formation d'une base de Schiff avec une lysine du site actif. Étant donnée que l'enzyme en présence du PLP est encore capable de former la base de Schiff avec le DHAP, la lysine impliquée dans la formation du complexe avec le PLP est donc une autre lysine que la Lys-229 qui elle forme la base de Schiff avec le substrat FBP et avec le DHAP. L'identité de cette lysine a été révélée par la réduction du complexe aldolase-PLP avec du borohydrure de sodium marqué radioactivement (Anai et al., 1973). Il a été conclu que cette lysine est la Lys-107.

L'étude cinétique du mutant K107M montre une activité résiduelle de 3.8% et une augmentation du K_m avec le FBP (Figure 46). L'étude cinétique des mutants (K107M et K107R) montre que la mutation du résidu 107 affecte effectivement la formation du complexe enzyme-FBP (Demoissac., 1995). Elle montre également une forte diminution de l'activité dans le cas du mutant K107M aux pH basiques qui permet de postuler l'implication du groupement ϵ -ammonium de la Lys-107 dans la liaison du substrat (Figure 46). Cette lysine, est probablement impliquée dans l'interaction avec le groupement phosphate à la position 6 du substrat (FBP).

S'il est évident que la Lys-107 semble affecter l'activité et la liaison du FBP, il reste par contre à éclaircir le mécanisme catalytique du mutant K107M. Le profil de pH de ce mutant montre des valeurs de pKa calculées à partir de l'activité catalytique de 4.94 et 6.92 et

à partir du rapport k_{cat}/K_m de 5.76 et 6.71. Les pKa de la chaîne latérale d'un aspartate, glutamate ou lysine sont 3.96, 4.32 et 10.20 respectivement, et celle de la base de Schiff protonnée est aux alentours de 7 (Voet et Voet., 1990). Nous pouvons donc associer ces pKa calculés à partir du facteur k_{cat}/K_m et de l'activité catalytique soit à des résidus acides ou basiques du site actif ou à l'intermédiaire base de Schiff protonnée du substrat FBP ou DHAP. Notons qu'il n'y a pas de résidu histidine dans le site actif et que les valeurs de pKa (standards) peuvent varier considérablement selon le milieu dans lequel les résidus, ou les intermédiaires réactionnels se trouvent. En effet, la détermination de la constante d'équilibre de la formation et de l'hydrolyse de la base de Schiff du PLP et du n-hexylamine montre que le pKa de la base de Schiff peut varier de 12.5 à 11.3 en changeant le rapport éthanol/eau de 3/17 à 49/1 (Donoso et al., 1986).

Dans le but de comprendre l'implication de ces résidus dans le comportement cinétique du mutant K107M, l'étude structurale a été entamée. La structure cristallographique du mutant K107M est déterminée et affinée à 2.46 Å de résolution. Elle a permis d'effectuer une comparaison globale et détaillée entre la structure de K107M et celle de l'aldolase native. La structure cristallographique de ce mutant a permis de faire une analyse des changements survenus aussi bien au niveau du site actif qu'au niveau de toute la structure. Elle a permis d'élucider l'effet structural de la mutation de la Lys-107 en méthionine et le rôle de ce résidu dans la catalyse enzymatique de l'aldolase.

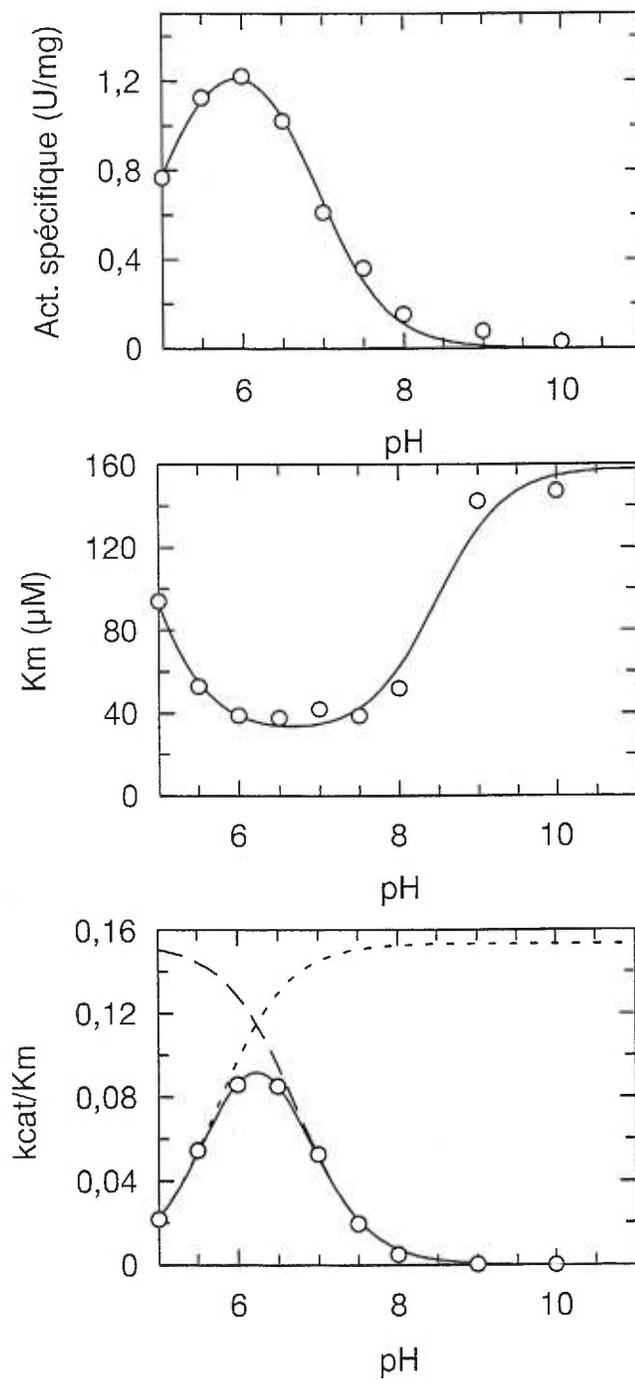


Figure 46 : Profils de pH du mutant K107M de l'aldolase du muscle de lapin.

3.10.2 Analyse structurale du mutant K107M

La cristallisation du mutant K107M s'est faite selon la technique "Batch". Les valeurs finales obtenues à la fin de l'affinement pour le mutant K107M sont représentées dans le tableau XXVI. Le diagramme de Ramachandran (Ramachandran et al., 1968) (Figure 47) montre la qualité du modèle final. La comparaison de la structure du mutant K107M et de l'aldolase native montre une faible variation de 0.2 Å entre les C α des résidus, la partie C-terminale exclue (Figure 48). Notons que la structure tetramérique ainsi que les structures secondaires de K107M sont conservées par rapport à celles de l'aldolase native. La carte de densité électronique démontre la présence de la lysine 107 mutée en méthionine (Figure 49).

L'analyse de la structure de ce mutant montre des modifications dans la chaîne principale et latérale de plusieurs résidus du site actif qui sont susceptibles d'affecter le mécanisme catalytique. L'analyse est focalisée sur deux points essentiels, la compréhension des facteurs influant sur la nucléophilicité de la lysine 229 formant la base de Schiff avec le substrat FBP et des facteurs qui ont causé la déstabilisation du DHAP chez le mutant K107M.

3.10.3 Analyse des sites actifs

Puisque la méthionine et la lysine ont le même volume de van der Waals, le changement engendré par la mutation est surtout situé au niveau de la suppression du groupement ϵ -ammonium fonctionnel de la Lys-107 (Figure 49). La Met-107, issue de la mutation, a une conformation différente de celle de la lys-107. Sa chaîne latérale est dirigée vers celle de la Phe-79 qui est le résidu hydrophobe le plus proche (Figure 50). Elle a subi une rotation de 48° par rapport à la liaison C β -C γ dans la direction contraire de la Lys-146. Nous constatons que la conformation de la Met-107 est identique dans les quatre sites actifs du tétramère. Les résidus du site actif qui ont subi également un changement conformationnel sont la Lys-146 et l'Asp-33 qui sont les proches voisins de la Lys-107 qui seront analysés dans les quatre sous-unités.

Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille a, b, c (Å)	164.19 , 57.57 ,85.35
α, β, γ (°)	90, 102.66, 90
Résolution maximum (Å)	2.46
Nombre total de réflexion	56905
Nombre de réflexions uniques	38414
Completeness (%)	
2.56 – 12 Å	82
2.46 – 2.56 Å	74
*R _{sym} (%)	11
<hr/>	
Intervalle de résolution (Å)	12 – 2.464
Nombre de réflexions (F > 1σ F)	38414
Nombre d'atomes	15910
Nombre de molécules d'eau	2334
**R _{fact}	17.9
***R _{free}	23.4
B _{moy} (Å ²)	16
B _{C-terminal} (Å ²)	72
<hr/>	
r.m.s. Déviation / valeurs idéales	
r.m.s.d. des liaisons (Å)	0.006
r.m.s.d. angles de torsions (°)	1.48
r.m.s.d. angles dièdres (°)	21.5
r.m.s.d angles impropres (°)	1.1
Ramachandran	
Conformations non permises	3
Conformations tolérées	4

Tableau XXVI : Données cristallographiques de l'affinement du mutant K107M.

* $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl)| - \overline{|F_i(hkl)|}}{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl)|}$, est le nombre de réflexions observables

** $R_{fact} = \frac{\sum_{hkl} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_o(hkl)|}$.

*** $R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|}{\sum_{hkl \in T} |F_o(hkl)|}$, T est l'ensemble des données sélectionnées aléatoirement sur 8% total des données et il est utilisé tout le long de l'affinement.

B_{moy} : facteur d'agitation thermique moyen des atome.(partie C-terminale exclue).

B_{C-terminale} : facteur d'agitation thermique des résidus (343-363).

r.m.s d : déviation par rapport à la moyenne.

"Completeness" : le pourcentage des données collectées qui sont complètes.

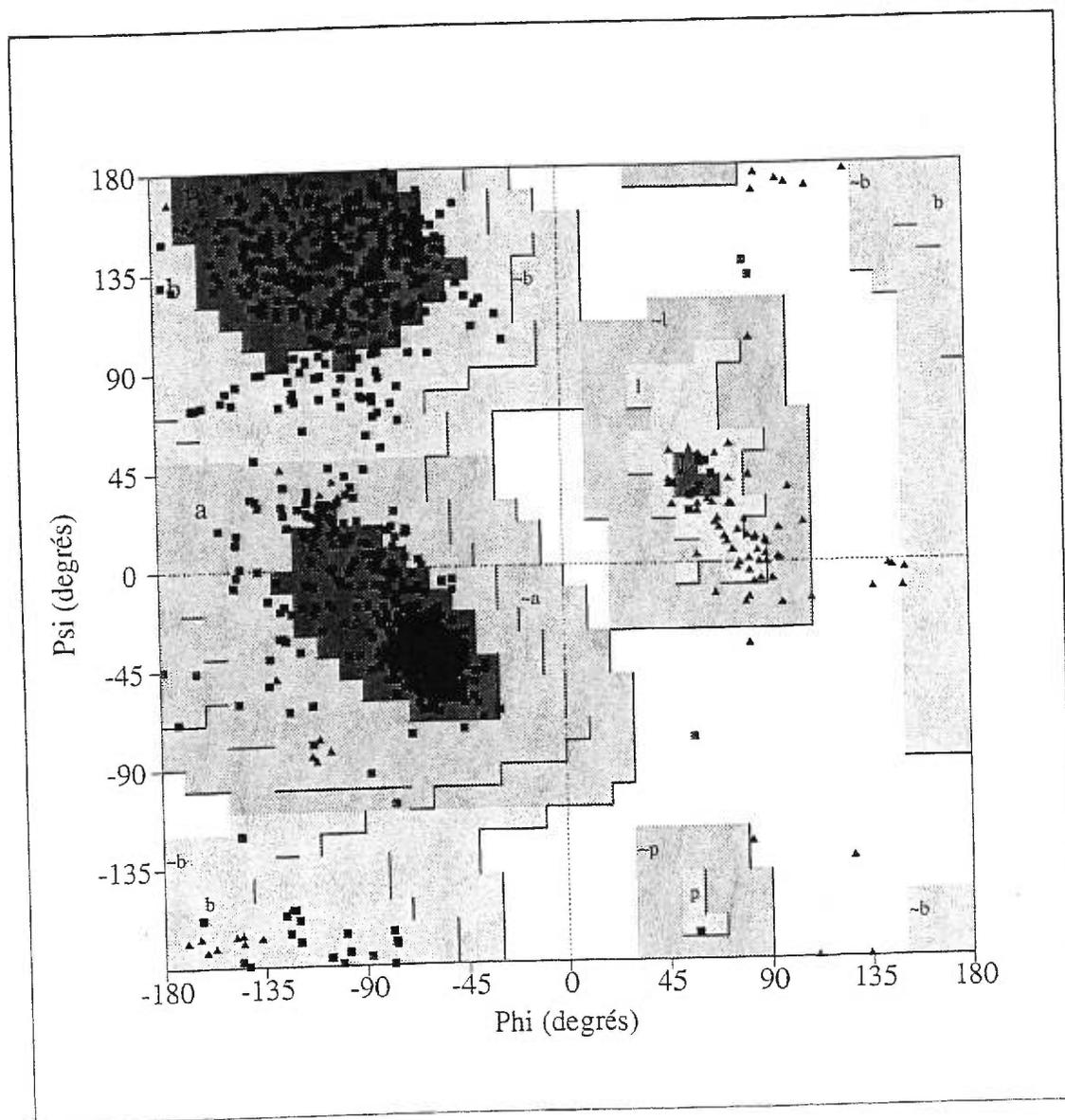


Figure 47 : Diagramme de Ramachandran du mutant K107M de l'aldolase du muscle de lapin

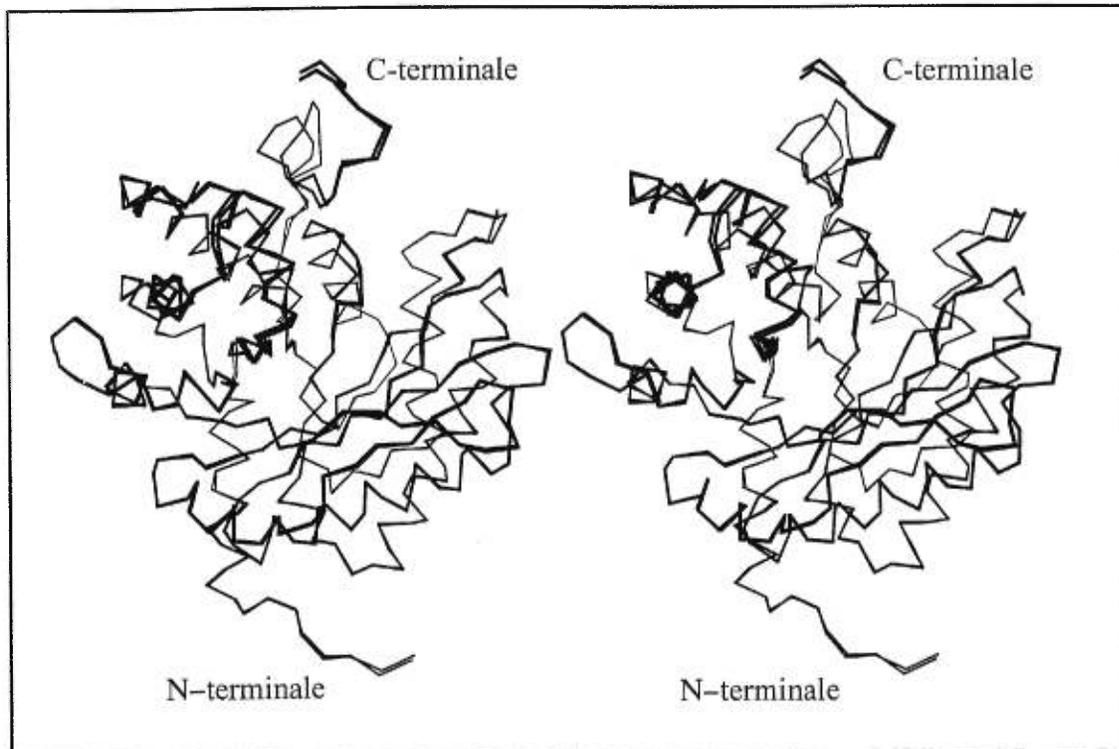


Figure 48 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_{α} de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et celle du mutant K107M.

Sous-unité 1. Dans cette sous-unité, la chaîne latérale de la Lys-146 a subi le plus de changements conformationnels. Son groupement ϵ -ammonium s'est déplacé de 1.2 Å par rapport à sa conformation initiale. Elle s'est éloignée de l'Asp-33 qui n'a pas changé de conformation et s'est rapprochée de 0.6 Å du Glu-187. Nous remarquons aussi que la distance entre le N_z de la Lys-229 et le O_γ de la Ser-300 est de 3.3 Å au lieu de 2.9 Å dans l'aldolase native.

Sous-unité 2. Dans cette sous-unité, la Lys-146 a subi une rotation de 82° autour de son $C_\beta-C_\gamma$. Son groupement ϵ -ammonium est placé entre les chaîne latérale résidus Asp-33 et Glu-187, à une distance de 3.68 Å et 3.26 Å respectivement tout en se rapprochant de 0.5 Å en direction du Glu-187. La Lys-229 interagit avec la Ser-300 à une distance de 3 Å.

Sous-unité 3. Nous constatons le même phénomène de rapprochement de la Lys-146 vers le Glu-187 suite à son déplacement de 1.1 Å. La distance entre les groupements fonctionnels de la Lys-146 et les résidus Glu-187 et Asp-33 est de 3.05 et 3.96 Å respectivement.

Sous-unité 4. Cette sous-unité est semblable à celle de l'aldolase native. La distance entre le N_z de la Lys-146 et le carbonyle du Glu-187 et de l'Asp-33 est de 3.1 Å et 3.6 Å respectivement. Les résidus qui sont situés à l'entrée du site actif et qui interagissent avec la partie C-terminale sont l'Arg-42 et l'Arg-303. Ces dernières sont anti-parallèles et interagissent respectivement avec le Glu-34 et le Glu-354 qui se trouvent de part et d'autre de chacune d'elles. Ces arginines ont subi un changement conformationnel dans les quatre sous-unités. Cependant, étant donné que leur densité électronique est faiblement définie dans les 2 premières sous-unités, il est difficile de quantifier ce changement. Cependant, dans les sous-unités 3 et 4 leurs positions sont clairement définies et montrent que leur nouvelle conformation est différente de celle dans l'aldolase native.

	SU1	SU2	SU3	SU4
Lys-229	3.32 Å Ser-300 3.31 Å Lys-146	-	3.2 Å Lys-146	3.26 Å Ser-300
Lys-146	3.01 Å Glu-187 3.4 Å Asp-33	3.41 Å 2545 H ₂ O(80) 3.26 Å Glu-187	3.05 Å Glu-187 3.09 Å 3785 H ₂ O(40) 3.2 Å Lys-229	3.7 Å Glu-187 3.3 Å Asp-33
Met-107	3.37 Å 1411 H ₂ O(4)	-	3.37 Å 3472 H ₂ O(20)	-
Glu-187	3.01 Å Lys-14	3.12 Å Glu-189	2.7 Å Lys-146	3.18 Å 4792 H ₂ O(38) 3.05 Å Glu-189
Glu-189	2.9 Å Arg-148 3.2 Å Glu-187 3 Å 1532 H ₂ O(22)	2.5 Å Arg-148	3.18 Å 3901 H ₂ O(30) 3.34 Å 3785 H ₂ O(40)	3.4 Å 4602 H ₂ O(47)
Arg-148	3.16 Å 1707 H ₂ O(28) 2.9 Å Glu-189	2.87 Å 2581 H ₂ O(88)	3.11 Å Glu-189	3.2 Å Glu-189
Asp-33	2.9 Å 1650 H ₂ O(25)	3.7 Å Lys-146	3.18 Å 3901 H ₂ O(15) 3.34 Å 3785 H ₂ O(40)	3.42 Å 4602 H ₂ O(47)
Asp-109	3.38 Å 1371 H ₂ O(22) 3.16 Å 1600H ₂ O(25)	3.2 Å 2376 H ₂ O(4)	3.26 Å Met-107	-

Tableau XXVII : Interactions des acides aminés du site actif du mutant K107M de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses.

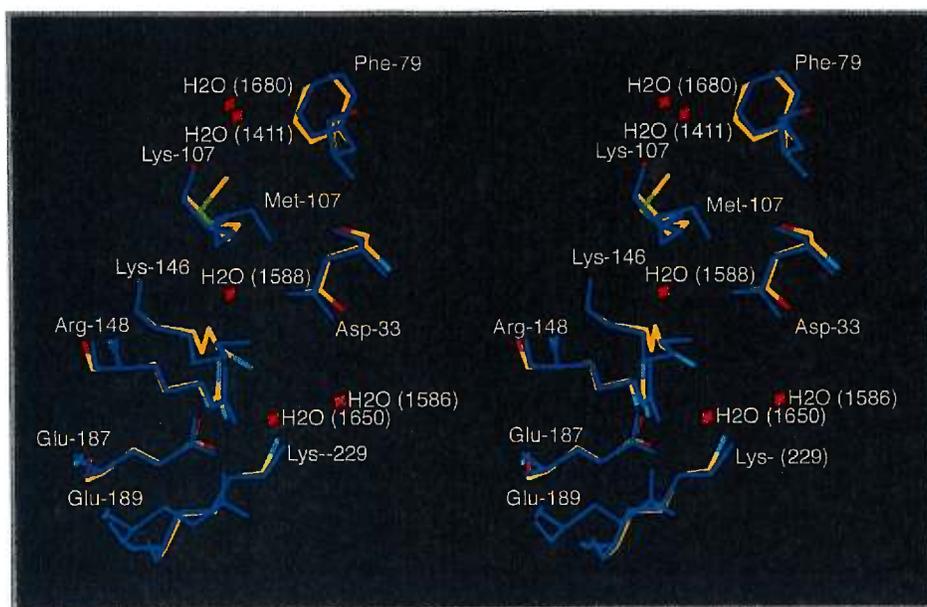


Figure 49 : Représentation en stéréo de la superposition du site actif de la sous-unité 1 du mutant K107M et de celle de l'aldolase du muscle de lapin (bleu).

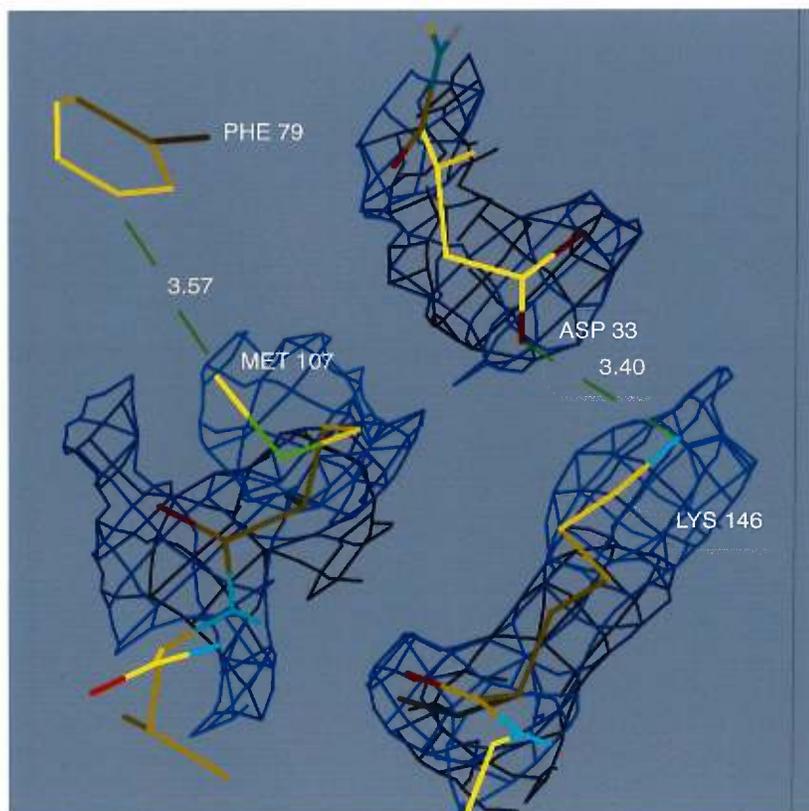


Figure 50 : Densité électronique correspondant à la Met-107 du site actif dirigée vers le résidu hydrophobe le plus proche (Phe-79) dans la sous-unité 1 du mutant K107M de l'aldolase du muscle de lapin

3.10.4 Analyse de la partie C-terminale

Les résidus de la partie C-terminale (344-363) ont une densité électronique difficilement interprétable dans les sous-unités 1 et 2 uniquement. La partie C-terminale se rapproche vers la surface du site actif et se trouve séparée de celle-ci à une distance maximale de 3 Å. Ce rapprochement présent dans tout le tétramère, est moindre dans les sous-unités 3 et 4 où la partie C-terminale a plus d'interactions avec le reste de la structure. Cette partie, dans la sous-unité 3 et 4 a donc moins de flexibilité et se termine par une interaction entre la Tyr-363 et l'Arg-258. Les deux hélices formées par les résidus 35 à 48 et 314 à 327 ont changé de position et se trouvent à proximité de la partie C-terminale, à une distance moyenne de 9 Å de chaque côté. Ces hélices, forment ainsi un canal qui mène au site actif. La variation de leur C_{α} est de 0.3 à 2.76 Å pour l'hélice 35 à 48 et de 0.83 à 0.2 Å pour l'hélice 316 à 320.

L'analyse structurale du mutant K107M montre l'absence de tout substrat ou produit de la réaction catalytique dans ses sites actifs. Dans cette structure, nous remarquons que les Arg-303 et 42 sont anti-parallèles et ont les mêmes interactions que dans la native. Les deux groupements SO_4^{-2} sont présents dans deux sites qui sont équivalents à ceux de l'aldolase native et possèdent le même type d'interactions avec des résidus qui n'ont subi aucun changement conformationnel.

3.10.5 Discussion

Les études cinétiques du mutant K107M ont montré que la charge positive de Lys-107 augmente l'affinité de l'enzyme pour son substrat le FBP. L'activité spécifique de ce mutant est 20 fois moindre que celle de l'aldolase native (0.6 unités/mg) et les valeurs des pKa des résidus responsables du clivage du FBP également transformées montrent que la Lys-107 est non seulement impliqué dans la liaison du substrat FBP mais aussi dans la catalyse de l'aldolase.

Les changements structuraux de ce mutant montrent que le site actif n'a pas subi d'importants changements conformationnels et que les principales différences relevées sont le rapprochement de la Lys-146 du Glu-187 ainsi que son éloignement par rapport à l'Asp-33. Ces trois résidus sont impliqués dans les étapes de transferts de proton avec le substrat. La Lys-107 mutée en méthionine possède une chaîne latérale qui est orientée vers la Phe-79, dans une orientation opposée à celle qu'elle avait dans l'aldolase native c'est-à-dire proche de l'Asp-33. La Met-107 s'est donc dirigée vers une région hydrophobe du site actif. Ce phénomène est observé dans les quatre sous-unités. Ceci nous amène à supposer que cette lysine dans l'aldolase native, la Lys-107 est stabilisée par une liaison hydrogène avec l'Asp-33 est que sa position facilite son interaction avec le groupement phosphate sur le carbone C₆ du substrat FBP (Shapiro et al., 1968). L'interaction de la Lys-107 avec ce groupement phosphate est également démontrée chez l'aldolase de foie (Blom, non publié).

En effet, grâce à l'interaction de la Lys-107 avec le pyridoxal phosphate, le pKa de cette lysine chez l'aldolase native a pu être mesuré et il est aux alentours de 7.2 (Blonski, non publié). La mutation de la Lys-107 montre son importance dans l'interaction entre la Lys-146 et l'Asp-33 qui se répercute au niveau des étapes catalytiques. Les changements subis par ces deux résidus appuient cette hypothèse. Effectivement, l'interaction de la Lys-107 avec l'Asp-33 permet de la stabiliser dans une position qui facilite la fixation du groupement phosphate du carbone C₆ du FBP. Par des études de mutagenèse dirigée (Morris et Tolan., 1993), l'Asp-33 a été considéré plus ou moins directement responsable de

neutralité de la chaîne latérale de ce résidu limite sa fonction à sa participation à la stabilisation du substrat et abolit l'hypothèse de l'arrachement de proton des intermédiaires réactionnels aussi bien avec le DHAP qu'avec le FBP.

Dans le mutant K107M, la Lys-146 s'éloigne de l'Asp-33 en direction du Glu-187, ceci suppose que l'Asp-33 est probablement neutre. En effet la Met-107 est un résidu hydrophobe qui fait augmenter la valeur de pKa de l'Asp-33. L'hypothèse de neutralité de l'Asp-33 non seulement dans la structure de ce mutant, mais aussi dans celle de l'aldolase native, nous amène à un changement radical dans le mécanisme enzymatique proposé pour l'aldolase. Il explique le rôle réel de l'Asp-33 dans la stabilisation du DHAP sous sa forme Michaelis en interagissant avec son groupement carbonyle (Blom et Sygusch., 1997) qui ne peut exister que si celui-ci est neutre. En effet, le profil de pH du mutant D33N montre uniquement une baisse de l'activité enzymatique sans changement des pKa des groupements impliqués dans la catalyse (Demoissac, 1995, annexe2). Ce résultat appuie l'hypothèse de la neutralité de l'Asp-33 dans la gamme de pH étudiée.

Lors de la catalyse, l'effet électrostatique peut perturber l'ordre de la stabilisation et le taux de formation des différents états de transitions. Cet effet engendre l'abaissement du pKa des résidus acides et basiques du site actif. Ces résidus sont aussi soumis à un effet hydrophobe dûe aux résidus (Leu-270, Val-150,...) qui contribuent à la diminution du pKa de la Lys-229 et à l'augmentation de celui du Glu-187. Cet effet hydrophobe est mis en évidence par l'analyse de la solvation des acides aminés du site actif (Figure 51). L'analyse de la solvation des lysines du site actif montre que les résidus ayant le plus d'interactions avec des molécules d'eau sont la Lys-146 ensuite la Lys-229 (Tableau XXVII). Cela est observé également chez l'enzyme native (annexe3). Les pKa de ces lysines doivent être du même ordre que ceux de l'aldolase native qui ont été démontrés dans le cas de K107M et K146M être de l'ordre de 7.2 et 8.5 respectivement. Le pKa de la Lys-229 est compris donc entre ces deux valeurs. La figure 51 montre que la solvation varie d'un mutant à l'autre suite aux changements des interactions ioniques dans le site actif qui sont dues non seulement à la mutation mais dans le cas de E187A et E187Q aux changements conformationnels globaux.

L'implication de cette lysine 107 dans le mécanisme catalytique est démontrée par les études cinétique et isotopique effectuées sur le mutant K107M. Ces études démontrent une diminution importante de la vitesse d'échange du proton pro-S du DHAP ainsi qu'une diminution de l'activité spécifique vis à vis du substrat FBP. En effet, la Lys-107 intervient non seulement au niveau de l'échange de proton pro-S du DHAP mais probablement aussi dans les autres étapes de transfert de protons avec le FBP et le DHAP.

L'absence du DHAP est directement reliée à la réorganisation des résidus du site actif et à la partie C-terminale qui est différente de celle de la native. Puisque ce mutant a été purifié dans des conditions similaires à celle de l'aldolase de type sauvage, on supposait la présence du DHAP dans les sites actifs comme il avait été observé pour les sous-unités 1 et 2 de l'aldolase native. La déstabilisation du DHAP chez le mutant K107M est due aux changements conformationnels de la Lys-146, du Glu-187 et de la Ser-271. La partie C-terminale dans les deux premières sous-unités n'étant pas entièrement définie, il n'est pas possible d'évaluer son effet sur l'absence du DHAP.

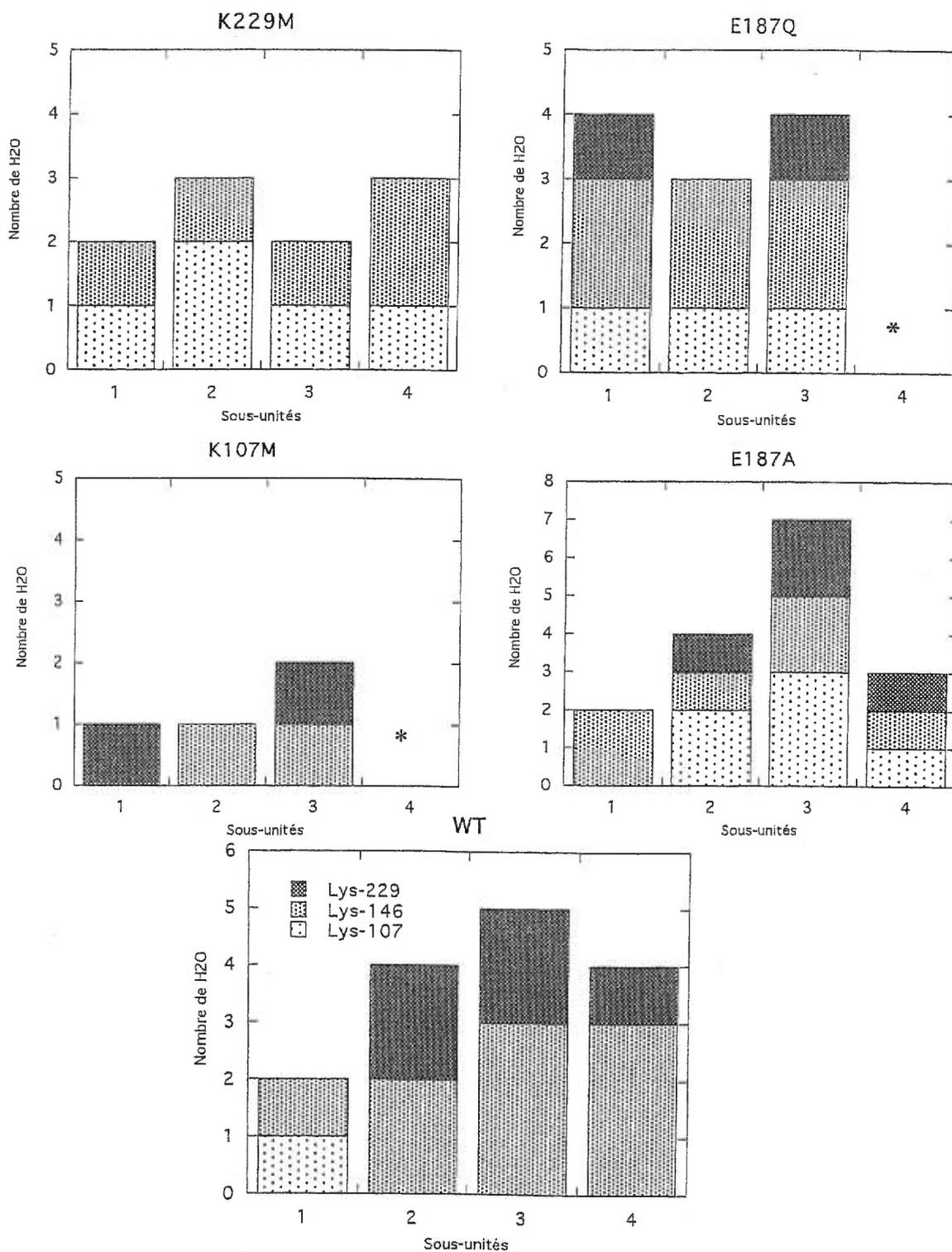


Figure 51 : Nombre des molécules d'eau interagissant avec les trois lysines (Lys-229, Lys-146 et Lys-1107) du site actif des quatre sous-unités des mutants K229M, E187Q, K107M, E187A et de l'aldolase native.

* : aucune solvataion des lysines 229, 146 et 107.

3.11 Étude structurale du mutant K229M de l'aldolase du muscle de lapin

3.11.1 Introduction

Les acides aminés du site actif présentent des caractéristiques conformationnelles étroitement liées à leurs rôles dans le mécanisme catalytique. L'étude de la mutation de la Lys-229 en méthionine vise à vérifier la fonction de son groupement amine dans le mécanisme catalytique de l'aldolase. L'étude de la cinétique enzymatique montre que le mutant K229M possède l'activité la plus faible comparativement à tous les autres mutants étudiés (10^6 fois moins actif que l'aldolase native). Ceci montre que ce résidu est directement impliqué dans la formation de la base de Schiff avec le substrat FBP et le DHAP. D'autre part, l'étude structurale par cristallographie aux rayons X du mutant K229M est réalisée dans le but de comprendre la relation entre sa structure et la forte diminution de sa fonction catalytique.

Le mutant K229M est cristallisé par la méthode "Batch" dans une condition similaire à celle de l'aldolase native soit 43% de sulfate d'ammonium, 100mM du tampon TEA et 5mM d'EDTA à pH 7,4. La détermination et l'affinement de cette structure sont effectués selon le protocole décrit précédemment. Les données cristallographiques obtenues par diffraction des rayons X ainsi que les statistiques obtenues à la suite de plusieurs cycles d'affinement cristallographique sont représentées dans le tableau XXVIII. La variation au cours des différentes étapes de l'affinement des deux facteurs (R_{free} , R_{fact}) et le diagramme de Ramachandran (Figure 52) démontrent la convergence de l'affinement et la qualité du modèle cristallographique final du mutant K229M.

Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille a,b,c (Å)	164.24 , 57.1 ,85.05
α, β, γ (°)	90, 102.65, 90
Maximale résolution (Å)	2.6
Nombre total de réflexions	87439
Nombre de réflexions uniques	48198
"Completeness" (%)	
2.72 – 12 Å	81
2.6 – 2.72 Å	74
*R _{sym} (%)	10
Intervalle de résolution (Å)	12 – 2.6
Nombre de réflexions (F > 1σ F)	34787
Nombre d'atomes	15586
Nombre de molécules d'eau	2189
**R _{fact}	17.72
***R _{free}	23.15
B _{moy} (Å ²)	20
B _{C-terminal} (Å ²)	79
r.m.s. Déviation / valeurs idéales	
r.m.s.d. des liaisons (Å)	0.011
r.m.s.d. angles de torsions (°)	1.806
r.m.s.d. angles dièdres (°)	22.473
r.m.s.d angles impropres (°)	1.708
Ramachandran	
Conformations non permises	0
Conformations tolérées	3

Tableau XXVIII : Données cristallographiques de l'affinement du mutant K229M.

* $R_{sym} = \frac{\sum \sum_{hkl} |F_i(hkl)| - \overline{|F_i(hkl)|}}{\sum \sum_{hkl} |F_i(hkl)|}$ est le nombre des réflexions observables

** $R_{fact} = \frac{\sum_{hkl} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)||}{\sum_{hkl} |F_o(hkl)|}$.

*** $R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)||}{\sum_{hkl \in T} |F_o(hkl)|}$, T est l'ensemble des données

sélectionnées aléatoirement sur 8% des données totales et il est utilisé au cours de l'affinement.

B_{moy} : facteur d'agitation thermique des résidus (partie C-terminale exclue).

B_{C-terminal} : facteur d'agitation thermique des résidus (343-363).

r.m.s : déviation par rapport à la moyenne "root mean square".

"Completeness" : pourcentage des données complètes.

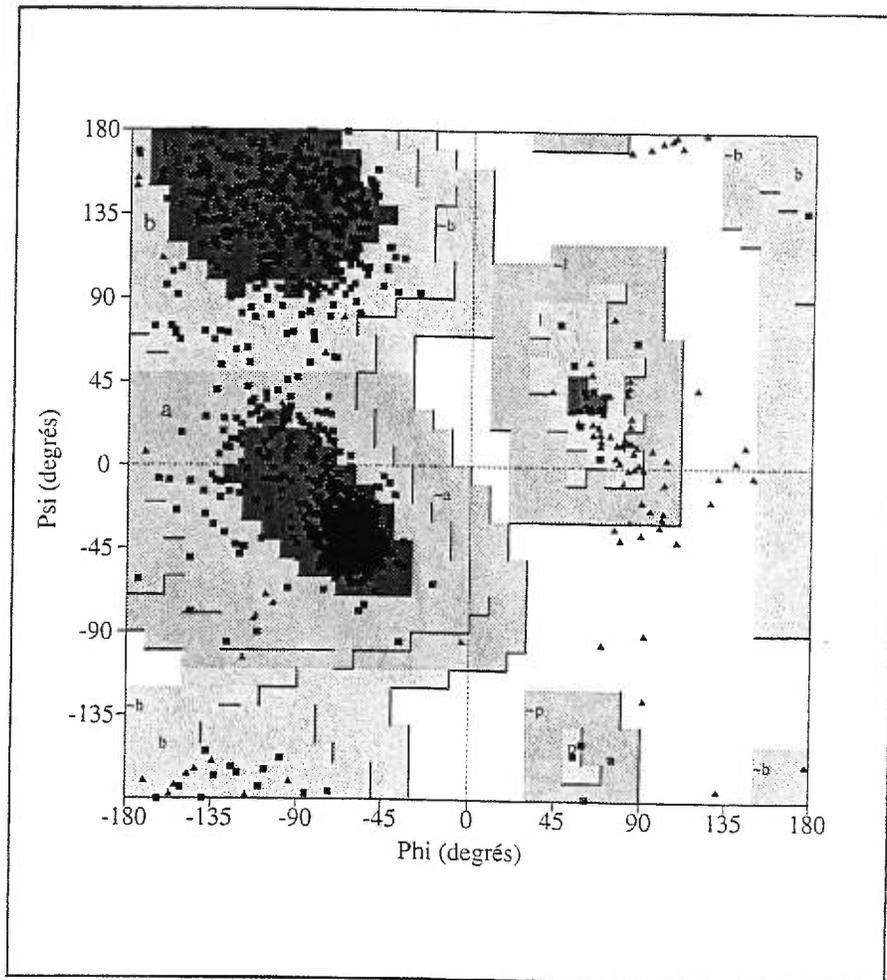


Figure 52 : Diagramme de Ramachandran du mutant K229M de l'aldolase de muscle de lapin.

3.11.2 Analyse structurale du mutant K229M

L'analyse de la structure tridimensionnelle du mutant K229M montre que celui-ci présente le même repliement tridimensionnel que l'aldolase native. L'examen de la carte de densité électronique présente des différences majeures entre les parties C-terminales des quatre sous-unités ainsi que plusieurs différences localisées dans différentes parties de la structure. Cependant, même si la structure quaternaire de K229M a varié par rapport à celle de l'aldolase native, la comparaison des C_{α} montre une faible variation de 0.2 à 0.5 Å par monomère (Figure 53). Comme la partie C-terminale formée par les résidus 344 à 363 possède plus de variabilité conformationnelle que le restant de la structure, elle a été exclue lors de la comparaison des C_{α} entre monomères équivalents. Parmi les résidus qui ont subi d'importantes modifications de leur chaînes latérales, comptent ceux situés à la surface de la protéine. C'est plus précisément le cas des lysines à la surface de la protéine dont les chaînes latérales ont des interactions en majorité avec le solvant. Pour la suite, nous nous sommes intéressés à la comparaison entre la structure de l'aldolase native et celle du mutant K229M dans les différentes sous-unités.

3.11.3 Analyse du site actif

La mutation de la Lys-229 en méthionine a engendré un réarrangement des résidus avoisinants. La méthionine, plus hydrophobe que la lysine, s'est dirigée vers les résidus hydrophobes voisins. L'espace libéré par ce réarrangement est comblé par les résidus voisins. L'analyse des sites actifs des quatre sous-unités est décrite ci-dessous :

Sous-unité I. L'identification des différences structurales montre qu'elles sont principalement situées aux alentours du résidu muté, la Met-229 dont la chaîne latérale a subi une rotation de 111° autour de la liaison carbone C_{β} - C_{γ} en direction des deux résidus hydrophobes les plus proches soit l'Ile-185 et l'Ile-77. L'espace libéré par ce changement conformationnel est comblé par la Leu-270 qui s'est avancée grâce à une rotation de 45° autour de la liaison C_{α} - C_{δ} . Ce nouveau réarrangement libère un autre espace qui va être occupé par l'Asn-231 qui, contrairement à la structure native, a subi une rotation de 157° autour de C_{α} - C_{β} vers l'intérieur du site actif (Figure 54).

Dans la sous-unité 1 de l'aldolase native, l'Arg-303, est un résidu important qui stabilise le DHAP. Sa nouvelle conformation étant faiblement définie, il est difficile de connaître son impact quant à l'absence du DHAP dans le site actif. Par contre, l'Arg-42 a gardé une conformation identique à celle qu'elle avait dans l'aldolase native et conserve son interaction avec le Glu-34.

Sous-unité 2. La Met-229 conserve sa conformation parallèle au Glu-187. La distance de la Met-229 par rapport à la Ser-300 est de 4 Å. La chaîne latérale de la Lys-146 s'est éloignée de 0.6 Å du Glu-187. L'Asn-231 a subi la même rotation que dans la sous-unité 1 et sa chaîne latérale est également dirigée vers l'intérieur du site actif de manière à adopter une conformation parallèle à celle des Glu-187 et 189. Dans cette sous-unité, l'Arg-303 dont la densité électronique est bien définie, subit une rotation de 97° autour de la liaison C_β-C_γ et induit un déplacement de son groupement N_z de 1 Å. Sa nouvelle conformation est éloignée de la position qu'elle adopte chez l'aldolase native qui lui permettait la stabilisation du DHAP dans le site C.

Sous-unité 3. Dans cette sous-unité, les deux changements majeurs dans le site actif sont ceux reliés à la Lys-146 ainsi qu'à l'Asn-231. La Lys-146 est encore plus éloignée du Glu-187 que dans les sous-unités précédentes (0.8 Å) et son groupement amine N_z est distant du groupement O_{ε2} du Glu-187 de 4.21 Å au lieu de 3.4 Å chez l'aldolase native. Cependant, même si la Lys-146 possède la même interaction avec l'Asp-33 que chez l'aldolase native elle possède une légère variation. La distance entre le groupement N_z de la Lys-146 et le O_{ε2} de l'Asp-33 est de 2.73 Å au lieu de 2.98 Å chez la native. Le seul résidu en dehors du site actif ayant subi un grand changement est l'Asn-231 dont la chaîne latérale a subi la même rotation que dans les sous-unités 1 et 2, c'est-à-dire vers l'intérieur du site actif. L'Arg-303 et 42 ont subi une rotation de 68° et 22.6° respectivement autour de C_γ-C_δ ce qui provoque une différence quant à leur orientation.

Sous-unité 4. La Lys-146 a subi un déplacement de faible amplitude de son groupement Nz en direction de l'Asp-33 (0.3 Å) dans le sens opposé du Glu-187. Les principaux changements sont ceux reliés à l'Asn-231 et aux deux arginines, 303 et 42. L'Asn-231 a subi la même rotation vers l'intérieur du site actif que celui observé dans les sous-unités précédentes. L'Arg-42 a subi une rotation de 96° dans le sens opposé du Glu-34 et l'Arg-303 une rotation de 75° en direction de l'Arg-42. La nouvelle orientation de ces deux arginines leur permet d'adopter une nouvelle position dans laquelle elles sont antiparallèles et contribue à augmenter la stabilité de leur chaînes latérales.

	SU1	SU2	SU3	SU4
Met-229	-	-	-	-
Lys-146	3.28 Å Glu-187 3.53 Å Asp-33 3.5 Å 1494 H ₂ O(28)	3.11 Å 2452 H ₂ O(31) 2.9 Å Asp-33	3.37 Å 3477 H ₂ O(33) 2.7 Å Asp-33	3.42 Å 4665 H ₂ O(43) 3.14 Å 4731 H ₂ O(2) 2.7 Å Asp-33
Lys-107	3.35 Å 2565 H ₂ O(19) 3.4 Å Asp-33	2.6 Å 2500 H ₂ O(30) 3.4 Å Asp-33 3.45 Å 2491 H ₂ O(47)	2.67 Å 3391 H ₂ O(2)	3.4 Å Asp-33 3.6 Å 4731 H ₂ O(2)
Glu-187	-	-	-	-
Glu-189	3.22 Å 1523 H ₂ O(28) 3 Å Arg-148	2.6 Å 2590 H ₂ O(57) 2.6 Å Arg-148	2.58 Å 3300H ₂ O(15)	3.4 Å H ₂ O 4665(42)
Arg-148	3.4 Å 1656 H ₂ O(20) 3 Å Glu-189	2.6 Å Asp-189 3.17 Å 2602 H ₂ O(71)	2.8 Å Glu-189	3.4 Å Glu-189
Asp-109	-	-	3.34 Å 3717 H ₂ O(36)	3.4 Å 4665 H ₂ O(42) 2.7 Å 4730 H ₂ O(16)
Asp-33	3.53 Å Lys-146 3.4 Å Lys-107 3.07 Å 1440 H ₂ O(2)	2.6 Å 2468 H ₂ O(50) 2.9 Å Lys-146	2.58 Å 3478 H ₂ O(11) 2.7 Å Lys-146	3.4 Å Lys-146

Tableau XXIV : Intéractions des acides minés du site actif du mutant K229M de l'aldolase du muscle avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est undiqué entre parenthèses.

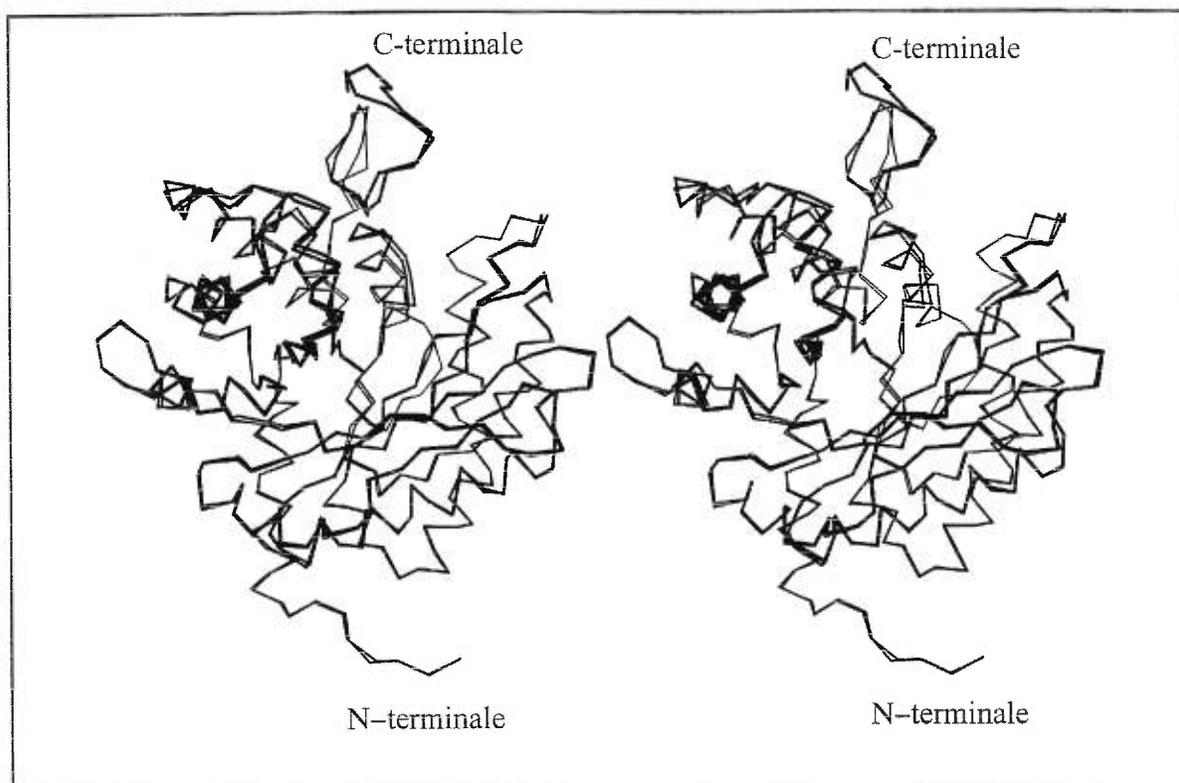


Figure 53 : Image en stéréo de la superposition des carbones C_{α} de la sous-unité 1 de l'aldolase du muscle de lapin native et celle du mutant K229M.



Figure 54 : Densité électronique correspondant à la Met-229 à proximité des résidus hydrophobes proches voisins (Leu-270, Ileu-185, Ileu-77) dans la sous-unité 1 du mutant K229M de l' aldolase du muscle de lapin.

3.11.4 Partie C-terminale

L'analyse de la partie C-terminale montre que même si celle-ci est très proche de celle de l'aldolase native chez les quatre sous-unités du tétramère, elle présente toutefois quelques changements conformationnels qui émanent de la création et de l'abolition des interactions entre ces résidus et ceux des hélices ou feuillets voisins. La densité électronique de cette partie formée par les résidus 344 à 363 dans les sous-unités 1 et 2 s'est beaucoup améliorée (moins de discontinuité de la densité électronique) lors des derniers cycles d'affinement et de modélisation et, ceci principalement grâce à l'ajout des molécules d'eau. Contrairement à l'aldolase native, K229M possède comme dans le cas des autres mutants étudiés, une proline à la place de la Ser-344. Cette proline, même si elle induit un changement d'orientation des résidus de 345 à 360, a peu d'influence sur la conformation globale de la partie C-terminale. Cette partie, même si elle reste identique à celle de l'aldolase native dans les quatre sous-unités, présente des changements conformationnels locaux au niveau de plusieurs résidus.

Lors des étapes finales de l'affinement du mutant K229M, la partie C-terminale a été entièrement localisée dans les quatre sous-unités, à l'exception de deux résidus qui sont l'Arg-303 et le Glu-354 de la sous-unité 1 dont la densité est faiblement définie, est attribué à leur mobilité conformationnelle. La partie C-terminale suit le même chemin que dans l'aldolase native mais avec des différences locales. Donc, son repliement global est identique à celui de l'aldolase native mais certaines chaînes latérales de ces acides aminés présentent une conformation et des interactions complètement différentes. Les carbones C_{α} de cette région, varient de 0.5 à 7 Å.

L'analyse structurale du mutant K229M montre que les hélices formées des résidus 39 à 50 et 330 à 350 ainsi que la partie C-terminale possèdent un facteur d'agitation thermique B élevé ($B_{\text{moy}} = 50 \text{ \AA}^2$). Cette valeur élevée est caractéristique de la flexibilité conformationnelle de cette région. Ces deux hélices ont des interactions avec le site actif et la partie C-terminale et sont plus exposées aux variations conformationnelles que le restant de la structure.

3.11.5 Discussion

La comparaison entre les structures de l'aldolase native et mutante ainsi que la détection des différences et leur interprétation démontrent l'existence de plusieurs contraintes structurales qui ne sont pas forcément impliquées dans la fonction de l'enzyme. Les principaux changements observés sont ceux produits par la rotation de la chaîne latérale du résidu Lys-229 muté en méthionine en direction des deux résidus hydrophobes les plus proches l'Ile-185 et l'Ile-77 et créent une énergie d'interaction favorable (Figure 54). Ces changements s'inscrivent dans le cadre des interactions hydrophobes à l'intérieur de la protéine.

L'analyse structurale de ce mutant, montre que la mutation de la Lys-229 en un résidu neutre n'engendre pas d'importants impacts au sein de la structure. Les similitudes observées dans la majorité des conformations des résidus montrent qu'effectivement cette mutation ne perturbe pas la structure de l'aldolase. Elle révèle donc le lien direct entre la diminution considérable de l'activité enzymatique (3.10^{-6} unités/mg) et la mutation ainsi que la neutralité de la lysine 229 chez l'aldolase de type sauvage.

On remarque que les faibles variations conformationnelles observées dans ce mutant sont identiques dans les quatre sous-unités même si leur amplitude varie légèrement d'une sous-unité à l'autre. Parmi elles, on constate un changement structural des résidus avoisinant la Lys-229. Ce changement est de faible amplitude et il est attribuable à l'abolition du groupement amine de la Lys-229. En fait, il correspond à l'éloignement de la chaîne latérale de la Lys-146 de celle du Glu-187 ainsi qu'à son rapprochement de l'Asp-33. Ce phénomène est plus accentué dans la sous-unité 3 que dans les autres sous-unités. Cependant, étant donné que le mutant K229M n'est plus actif, l'impact de ce changement structural ne peut être évalué sur sa réaction catalytique.

La troisième caractéristique du mutant K229M est le changement conformationnel subi par l'Asn-231 en direction du site actif dans les quatre sous-unités. Sa nouvelle conformation est parallèle aux Glu-187 et 189 (Figure 55). Cependant étant donné que l'Asn-

231 est située à l'extrémité du site actif, ce dernier ne pourrait intervenir dans le mécanisme catalytique. Le déplacement subi par l'Asn-231 est probablement lié à un changement structural qui s'est étendu par un déplacement qui est transmis en chaîne à partir de la mutation de la Lys-229 jusqu'à ce dernier et qui, aussi faible soit-il, a eu un impact important sur ce résidu.

Notons que, lors de la purification, le mutant K229M est récolté à travers la colonne d'affinité (CM) en utilisant le substrat FBP. Cela montre que le substrat FBP se lie à l'enzyme dans son site actif d'une manière non covalente, ce qui déclenche son détachement de la colonne. Contrairement à l'aldolase native, ce mutant ne possède pas de molécule de DHAP dans ses sites actifs. Ce phénomène peut être expliqué par la faible activité de l'enzyme muté qui, à partir du substrat FBP présent lors de la purification, produit une faible quantité de DHAP. Il peut être également relié aux changements structuraux des résidus qui stabilisent le groupement phosphate du DHAP au sein de la structure, à savoir l'Arg-303, la Gly-303, la Ser-271 et la Gly-272 (Blom et Sygusch., 1997). La mutation de la Lys-229 stabilisant le groupement O₂ et OH du DHAP chez l'aldolase native, est directement lié à l'absence du complexe Michaelis DHAP-aldolase.

L'analyse des résidus situés à l'entrée du site actif et qui stabilisent le DHAP montre l'existence de plusieurs changements structuraux. Ces changements ne sont pas forcément similaires dans les différentes sous-unités et n'obéissent pas à une règle générale. Dans la sous-unité 1, la chaîne latérale de l'Arg-303 s'est éloignée de celle de la Gly-273 de 6.31 Å au lieu de 3.5 Å chez l'aldolase native. Par contre, dans la sous-unité 2, elle s'en est rapprochée d'avantage. L'Arg-303 et le Glu-354 perdent leur liaison ionique dans la sous-unité 2. Dans la sous-unité 3, l'Arg-42 n'a subi qu'une faible rotation tandis que dans la sous-unité 4, sa position est totalement différente. Il est donc clair que ces changements ne peuvent que moduler la nature de leurs interactions par rapport au DHAP et qu'ils sont probablement liés à l'absence de celui-ci dans le site actif.

Il est donc clair que la mutation de la Lys-229 en méthionine n'engendre pas d'importants changements structuraux au niveau du site actif. D'où le fait que la perte d'activité est liée à la mutation. Le fait que la mutation de la Lys-229 par un résidu neutre dans le mutant K229M en n'affectant pas la conformation des résidus polaires avoisinants dans le site actif appuie cette hypothèse. Le pKa de cette lysine est probablement inférieur au pH de cristallisation 7,4 qui est également favorisée par son environnement hydrophobe. L'hypothèse de la neutralité de la Lys-229, favorable à l'attaque nucléophile qu'elle entame sur le substrat, est appuyée par l'étude des mutants E187A et E187Q (section 3.8 et 3.9). Cette hypothèse peut être confirmée par la synthèse d'un chromophore qui permet la mesure de son pKa. Les variations des conformations observées des résidus qui interagissent avec le DHAP chez l'aldolase native sont responsables de l'absence de ce dernier dans le site actif.

Les interactions entre les résidus de ce mutant avec les molécules d'eau diffèrent de ceux de l'enzyme native (annexe3). On remarque aussi, que globalement il y a moins de solvation chez le mutant K229M que chez l'aldolase native. Ceci est probablement dû au réarrangement global de la structure suite à la mutation (Tableau XXVIV).

3.12 Structures 3D des complexes aldolase-hexitol-1,6-bisphosphate et K229M-hexitol-1,6-bisphosphate

3.12.1 Introduction

L'intérêt dans l'étude des complexes aldolase-hexitol-1,6-bisphosphate est la détermination de la nature des résidus qui interagissent avec ce ligand dans le site actif. L'hexitol-1,6-bisphosphate est synthétisé au laboratoire à partir de la réduction du FBP par le borohydrure de sodium (Ginsburg et Mehler., 1966). L'hexitol-1,6-bisphosphate possède un hydroxyle lié au carbone C₂ et il est sous forme de deux énantiomères R et S qu'il est d'ailleurs difficile de séparer. La détermination de la structure 3D du complexe aldolase-hexitol-1,6-bisphosphate montrera laquelle de ces deux conformations est acceptée dans le site actif. Cet inhibiteur n'est pas rétroaldolisé et n'existe pas sous forme cyclique comme c'est le cas du FBP. C'est donc un très bon inhibiteur compétitif de l'aldolase ($K_i=0.4M$) et ceci même s'il ne peut former des intermédiaires covalents (comme l'immonium) avec l'aldolase de classe I.

La cristallisation et la détermination de la structure tridimensionnelle des complexes se sont faites selon la technique décrite précédemment. La structure cristallographique de ces deux complexes est déterminée et affinée à 2.44 Å de résolution pour K229M et 2.6 Å pour l'aldolase native. Après plusieurs cycles d'affinement et de modélisations, le modèle obtenu pour ces deux structures ne semble pas contenir l'hexitolbisphosphate dans aucune des sous-unités.

3.12.2 Analyse de la structure 3D

Le déplacement global des C_α dans les deux structures avec et sans hexitol-1,6-bisphosphate, ne dépasse pas 0.2 Å dans toute la structure, la partie C-terminale exclue. Les résidus du site actif n'ont pas subi de changement conformationnel dans les quatre sous-unités et ils sont identiques à ceux des structures sans DHAP. C'est le cas pour l'aldolase native et le mutant K229M.

Étant donné que l'hexitol-1,6-bisphosphate est absent dans le site actif nous avons décidé de pas terminer l'affinement de ces structures (Tableau XXVV). La partie C-terminale des sous-unités 1 et 2 n'étant pas entièrement localisé, à ce stade d'affinement et nécessite beaucoup plus de modélisation pour être localisée. Il est donc difficile de connaître le lien entre la conformation de cette partie et l'absence de l'hexitol-1,6-bisphosphate dans ces complexes. En effet, cet inhibiteur pour lequel l'aldolase a une plus grande affinité que pour son substrat FBP devrait se lier facilement au site actif.

Ces structures de ces complexes se sont donc avérées identiques à celles préalablement déterminées de l'aldolase native (Blom et al., 1997) et du mutant K229M (section 3.11). Le site actif de l'aldolase native, avec ou sans DHAP, obtenu par la présente étude, montre peu de différences entre les conformations des résidus. Ceci indique que la présence du DHAP ne perturbe pas les interactions des acides aminés dans le site actif. Le seul changement engendré par l'absence du DHAP est l'augmentation du nombre de molécules d'eau dans le site actif. L'absence de cet inhibiteur reste sujet à plusieurs hypothèses que nous pouvons malheureusement pas encore expliquées. Dans le cas du complexe K229M-hexitol-1,6-bisphosphate, la comparaison de sa structure à celle du mutant K229M déterminée à 2.6 Å montre qu'ils sont identiques. Étant donné que l'hexitol-1,6-bisphosphate est absent dans la structure du complexe, nous avons décidé de fusionner les données brutes (intensités) de son cristal qui diffracte à 2.44 Å de résolution avec celle du mutant K229M résolu à 2.6 Å (section 3.7.6). Cette fusion permettra d'améliorer la qualité de ce modèle et de produire plus de données de diffraction à haute résolution. Le facteur R_{merge} calculé à partir de la fusion de ces intensités selon le protocole décrit précédemment est de 58%. Cette valeur est trop élevée pour permettre de fusionner les intensités de ces deux cristaux. Nous avons donc pas pu améliorer la résolution de la structure de K229M déterminée à 2.6 Å préalablement. Ceci montre que la structure tridimensionnelle déterminée d'un cristal à un autre, et pour un même mutant de l'aldolase du muscle de lapin, il existe des conformations différentes adoptées principalement par la partie C-terminale. Cette partie située à la surface de la protéine possède probablement plusieurs conformations qui peuvent exister d'une manière équivalente.

	Aldolase – Hexitol-1,6- bisphosphate	K229M – Hexitol-1,6- bisphosphate
Groupe d'espace	P2 ₁	P2 ₁
Paramètres de maille a, b, c, (Å)	164.55, 57.46, 85.37	165.92, 58.32, 86.6 90
Angles α , β , γ (°)	90, 102.71, 90	90, 103.1, 90
Maximale résolution (Å)	2.6	2.44
Nombre total de réflexions	48137	61039
Nombre de réflexions uniques	33852	41028
Completeness (%)	87.5	84.5
*R _{sym} (%)	9	8
Intervalle de résolution (Å)	12 – 2.6	12 – 2.44
Nombre de réflexions (F > 1 σ F)	33852	41028
Nombre d'atomes	14269	15434
Nombre de molécules d'eau	677	1858
B-factor du modèle (Å ²)	18	20
**R _{fact}	21.31	20.48
***R _{free}	24.73	24.9

Tableau XXVV : Données cristallographiques de l'affinement des complexes Aldolase-hexitolbisphosphate et K229M-hexitolbisphosphate.

$$* R_{sym} = \frac{\sum \sum_{hkl} |F_i(hkl) - \overline{F_i}(hkl)|}{\sum \sum_{hkl} |F_i(hkl)|}, \text{ le nombre de réflexions observables}$$

$$** R_{fact} = \frac{\sum_{hkl} |F_o(hkl) - |F_c(hkl)||}{\sum_{hkl} |F_o(hkl)|}.$$

$$*** R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} |F_o(hkl) - |F_c(hkl)||}{\sum_{hkl \in T} |F_o(hkl)|}, \text{ où } T \text{ est l'ensemble des données}$$

sélectionnées aléatoirement sur 8% total des données et utilisées tout le long de l'affinement.

Bm : Facteur d'agitation thermique moyen des atomes.

r.m.s : deviation "root mean square"

CONCLUSION

Deux importantes approches permettent l'étude des macromolécules biologiques. L'approche structurale apporte un ensemble d'informations sur le repliement tridimensionnel des sites actifs et la nature des sites de liaison des ligands. L'approche cinétique, quant à elle, se charge de l'analyse de la fonction biologique de l'enzyme. L'utilisation de ces deux stratégies nous permet de réaliser plusieurs progrès dans la détermination du mécanisme enzymatique et permet une analyse approfondie de la relation structure-activité des protéines.

L'objectif visé par l'utilisation de divers domaines d'études dont le génie génétique, l'enzymologie, l'étude structurale est de permettre de comprendre et de résoudre le mécanisme d'action de l'aldolase du muscle de lapin. En effet, ce travail a fait appel à un large éventail de connaissances se traduisant par l'expression et les études cinétiques de certains mutants de l'aldolase qui sont corrélées au domaine de la détermination des structures 3D des protéines et de modélisation. Le programme proposé traite des rôles des acides aminés qui sont impliqués dans le mécanisme réactionnel de l'aldolase du muscle de lapin.

Les résidus ciblés sont conservés chez toutes les aldolases de classe I séquencées à ce jour et ont été judicieusement choisis afin de déterminer et d'interpréter leur impact aussi bien sur la cinétique enzymatique que sur la structure tridimensionnelle. Les mutations étudiées concernent des résidus du site actif (Lys-229, Lys-146, Lys-107, Glu-187, Asp-33, Ser-271) et un résidu supplémentaire situé loin du site actif l'Arg-258. Ce dernier interagit avec la Tyr-363 (dernier résidu de la partie C-terminale), dont le rôle dans la catalyse enzymatique n'est pas encore clairement défini.

Une partie importante des propriétés catalytiques provient des études cinétiques de certains mutants de l'aldolase du muscle et du foie de lapin. Ces travaux confirment l'implication de la Lys-229, la Lys-146, l'Asp-33, le Glu-187, la Ser-271 et la Lys-107 dans l'activité de l'aldolase. Ils nous permettent d'exclure le résidu Arg-258 comme essentiel dans la catalyse. L'analyse des profils de pH de ces mutants a ouvert la voie à plusieurs hypothèses dont, principalement, celle du mécanisme enzymatique des mutants E187Q et E187A.

Des études faites en parallèles sur ces mutants par des échanges isotopiques $^3\text{H}/^1\text{H}$ déterminent la nature de l'implication des résidus du site actif dans l'arrachement de l'hydrogène en C_3 du DHAP sous sa forme de base de Schiff. Le résultat qui en découle propose, de façon convaincante, que l'Asp-33 est le principal responsable dans l'arrachement de l'hydrogène pro-S du DHAP. La Lys-146 est le résidu qui stabilise le carbone C_3 dans la conformation où l'hydrogène pro-S est perpendiculaire au plan formé par les carbones du DHAP et qui lui permet d'être arraché. Ces résultats montrent également l'implication de la Ser-271, la Lys-107 et du Glu-187 dans cette étape du mécanisme. En effet, la Ser-271 stabilise le groupement phosphate du DHAP et le Glu-187 interagit avec l'hydroxyle du carbone C_2 du DHAP (Blom et Sygusch., 1997, Blom et Sygusch, non publié). Ces résidus du site actif de l'aldolase du muscle participent donc de différentes façons à l'abstraction de l'hydrogène pro-S, en stabilisant le DHAP de manière à permettre cette réaction.

De l'identification et la caractérisation des rôles des acides aminés impliqués dans la catalyse, nous passons à l'étude structurale et au mode d'action des mutants E187A, E187Q, K229M et K107M qui s'est avérée nécessaire à la vérification des hypothèses postulées à partir du volet cinétique. Grâce à une analyse rigoureuse par modélisation de ces mutants, il en découle d'importantes conclusions quant à leur mode d'action et à la nature des étapes dans lesquelles ils sont impliqués. Ces étapes seront énumérées ci-dessous.

La structure tridimensionnelle du mutant E187A et E187Q ont confirmé l'hypothèse de Westheimer proposée dans le cas de l'acétoacétate décarboxylase. Ces structures 3D montrent le rapprochement des groupements ϵ -ammonium des deux lysines 229 et 146. La structure 3D du mutant E187Q, en plus d'avoir confirmé l'hypothèse de Westheimer, a montré l'état de charge négatif de la chaîne latérale du Glu-187 chez l'aldolase native. L'analyse de ces mutants a permis de tirer des conclusions très convaincantes quant aux rôles, à l'état ionique des résidus étudiés et, par conséquent, sur la nature de leur implication dans les étapes du mécanisme qui seront discutées dans la suite.

L'ensemble de ces données physico-chimiques corrélées aux activités biologiques permet de concevoir le mode d'action de la Lys-229, du Glu-187, de la Lys-146, de la Ser-271, de la Lys-107 et de l'Asp-33.

4.1 Lysine 229

La caractérisation du mutant E187A et E187Q de l'aldolase du muscle de lapin nous a permis de comprendre d'importants points sur leur mécanisme enzymatique. La mutation du Glu-187, situé entre les deux lysines 229 et 146, en alanine et glutamine respectivement, entraîne une réorganisation des résidus du site actif conduisant au rapprochement de ces deux lysines. Cette proximité suppose un abaissement de la valeur du pKa de la Lys-229, responsable de la formation de la base de Schiff avec le substrat. Ce rapprochement est supporté par l'hypothèse de Westheimer dans le cas de l'acétoacétate décarboxylase. En effet, grâce à la structure tridimensionnelle du mutant E187A et E187Q, nous avons montré la proximité des groupements ammonium des deux Lys-146 et 229 qui provoque la neutralité de la lysine formant la base de Schiff avec le substrat. L'absence d'autres acides aminés proches de la Lys-229 qui soient capables d'accepter ou de donner des protons et la faible interaction de cette lysine avec des molécules d'eau montre que cette lysine est en faveur de la diminution de son pKa. Grâce à la présente étude, et pour la première fois, la liaison hydrogène entre groupement ϵ -

ammonium d'une lysine avec celle d'une autre lysine qui forme la base de Schiff est prouvée d'une manière structurale. Ce type d'interaction caractérise dorénavant deux enzymes dont la réaction catalytique se déroule via le processus de formation de base de Schiff avec le substrat.

L'existence de la Lys-229 sous sa forme neutre lui permet d'effectuer l'attaque nucléophile sur le carbonyle du substrat. Elle est favorisée par son environnement suffisamment hydrophobe (Ile-77, Ala-31, Ser-300) qui permet la diminution de son pKa. La Lys-229 étant peu affectée par les deux mutations prouve que ces deux mutants E187A et E187Q apportent des arguments structuraux nouveaux concernant la neutralité de cette lysine ainsi que chez l'aldolase native.

L'un des principaux résultats obtenus à partir de l'étude structurale du mutant K229M est d'apporter une preuve supplémentaire de confirmation de l'existence du résidu Lys-229 sous une forme neutre chez l'aldolase de type sauvage. En effet, la mutation de la Lys-229 par un résidu neutre (Méthionine) chez le mutant K229M ne perturbe aucunement son site actif.

4.2 Glutamate 187

Un des résultats tiré à partir de l'étude de ces mutants de l'aldolase est l'état ionique du Glu-187 chez l'enzyme native. La mutation du glutamate en glutamine chez le mutant E187Q a engendré des différences très significatives dans le site actif. Le premier changement est celui de la Lys-146 qui s'est éloignée du Glu-187. Le deuxième changement est la diminution de façon importante de la solvation de cette partie du site actif formée par le Glu-187, le Glu-189, la Lys-146 et la Lys-229. Le troisième changement est l'augmentation de l'hydrophobicité du site actif qui est favorisée par la diminution de la solvation du site actif. La prise en compte de l'interaction du groupement carboxylate de chaîne latérale du Glu-187 avec les molécules d'eau, qui à l'état chargé a une constante d'hydrophobicité 3 fois plus petite que celle du groupement

carboxylamine du (Gln-187), est la principale raison de ce phénomène. Le rapprochement de la Leu-270 en direction du Glu-187 et de la Lys-229 est un facteur supplémentaire favorable à la diminution du pKa de cette lysine.

La neutralisation de Glu-187 joue entraîne la destabilisation de la charge sur la Lys-229 et sur certains intermédiaires réactionnels. Le Glu-187 est capable d'effectuer des transferts de protons et principalement lors de la déshydratation de l'intermédiaire carbinolamine, et lors du clivage de la liaison C₃-C₄ du FBP (Figure 55).

4.3 Lysine 146

La Lys-146 agit avec l'Asp-33 dans la stabilisation du carbone C₃ du DHAP nécessaire à la déshydratation de la carbinolamine, étape qui précède la formation de la base de Schiff cationique. La Lys-146 peut se rapprocher du Glu-187 ou de l'Asp-33 selon le type de la mutation effectuée. En effet, dans la structure de K107M, on observe un rapprochement de la Lys-146 vers le Glu-187 et chez celle du mutant E187Q vers l'Asp-33. La flexibilité de la Lys-146 lui permet d'interagir avec ces deux résidus ainsi qu'avec le substrat et d'augmenter son efficacité lors de plusieurs étapes catalytiques. Le pKa de cette lysine chez l'enzyme de type sauvage est de 8.5 (Hartman et Brown., 1976). Cette lysine est postulée participer à la déshydratation du FBP sous forme de carbinolamine et à la stabilisation du DHAP.

4.4 Aspartate 33

Chez l'aldolase native et, en raison de son interaction avec le carbonyle du DHAP dans la sous-unité 1 et 2, la chaîne latérale de l'Asp-33 ne peut être que sous forme neutre. Dans le mutant E187Q, l'Asp-33 est le deuxième résidu après la Lys-146 à avoir subi un important changement conformationnel dans le site actif. L'Asp-33 probablement chargée chez E187Q est étroitement liée à l'absence du DHAP puisqu'elle ne peut le stabiliser dans le site actif. En effet, le Glutamate 187 muté en glutamine (résidu neutre), le seul résidu qui reste dans le site actif impliqué dans la liaison avec le substrat et qui est acide, c'est l'Asp-33. L'augmentation de l'activité et du rapport k_{cat}/K_m aux pH acides chez E187Q montre que l'activité est liée à la neutralisation de l'Asp-33 nécessaire à la stabilisation du carbonyle du substrat dans le site actif.

À partir de l'étude cinétique par échange isotopique $^3\text{H}/^1\text{H}$, l'Asp-33 a été montrée comme le résidu responsable de l'échange de l'hydrogène pro-S en C₃ du DHAP avec l'eau lors de la formation de l'énamine. L'Asp-33 a un effet stéréoélectronique sur l'arrachement de ce proton.

4.5 Serine 271

Ce résidu stabilise le groupement phosphate du DHAP et joue un rôle important dans le maintien de la géométrie axiale du DHAP propice à l'arrachement de l'hydrogène pro-S de l'intermédiaire énamine. Ce résidu favorise la réaction d'aldolisation du DHAP et a pour rôle d'empêcher la formation du phosphate inorganique et du méthylglyoxal mis en évidence par réaction enzymatique grâce à l'alcool déshydrogénase (Grazi et al., 1978).

4.6 Résidus hydrophobes

Le site actif de l'aldolase enfoui dans le "cœur" de sa structure, possède plusieurs résidus hydrophobes (Leu-270, Val-150, Phe-79, Ile-185). Ces derniers, suite à leur proximité des résidus chargés contribuent à la diminution de leurs pKa et, principalement, de celui des lysines 229 et 146. Cette diminution est en faveur de la catalyse enzymatique de l'aldolase puisque l'intervalle de pH où la Lys-229 nécessaire à l'attaque nucléophile sur le substrat FBP augmente et principalement celui et permet ainsi à l'enzyme d'être active sur un large intervalle de pH. Dans le cas de la Leu-270, on remarque que la variation de la position de sa chaîne latérale chez les mutants E187A et E187Q révèle un important effet sur l'état de charge des résidus voisins, à savoir : la Lys-229 et le Glu-187 puisque qu'il favorise la diminution de solvatation de cette partie du site actif. Quant à la Val-150, le déplacement de sa chaîne latérale est étroitement relié à celui de l'Arg-158.

4.7 Molécule d'eau catalytique chez le mutant E187A

Un des résultats remarquables obtenus, est la mise en évidence d'une molécule d'eau occupant la cavité engendrée par la mutation glutamate en alanine. Cette molécule d'eau occupe une position proche de celle du carboxylate du résidu E187 chez l'enzyme sauvage. Elle tient le rôle de ce résidu chez ce mutant uniquement dans l'échange de proton et non dans la stabilisation des intermédiaires réactionnels. Cette molécule d'eau permet d'expliquer, entre autres, l'activité spécifique plus élevée du mutant E187A par rapport à celle du mutant E187Q dans l'eau qui devient presque égale dans D2O (article1).

4.8 Absence du DHAP chez les mutants K229M, K107M, E187A et E187Q

Parmi les principaux résultats qui découlent des structures 3D mutantes résolues, c'est le lien entre la réorganisation des résidus du site actif et l'absence du DHAP. En effet malgré l'utilisation des conditions de purification et de cristallisation similaire à celle de l'aldolase native, les quatre mutants ne lient pas dans leur site actif le DHAP. La

déstabilisation du DHAP soit au niveau du site de liaison de son groupement phosphate, de son hydroxyle ou de son carbonyle est la principale raison de son absence. La perte d'une ou de plusieurs liaisons hydrogènes entre les résidus du site actif et le DHAP est reliée au fait, que les résidus qui interagissent avec le DHAP ont une conformation non appropriée qui ne leur permet plus d'effectuer des liaisons hydrogène avec le DHAP. Pour certains résidus, ils créent un encombrement stérique par rapport aux conformations A, B et C du DHAP déterminées chez l'aldolase native.

4.9 Partie C-terminale

L'autre résultat important obtenu, concerne la détermination des différentes conformations de la partie C-terminale. Celle-ci se replie différemment d'une sous-unité à l'autre et d'un mutant à l'autre. En effet, chez l'aldolase native et chez les mutants E187A, E187Q, K229M et K107M, ces conformations sont la conséquence de la réorganisation du site actif. Ces structures montrent que les conformations de la partie C-terminales ne semblent obstruer, en aucun cas, le passage du DHAP vers le site actif. D'autre part, le passage d'une conformation à l'autre se manifeste par la capacité d'établir différents types de liaisons avec le restant de la structure.

La partie C-terminale agit comme un "bras" qui possède la possibilité de s'éloigner jusqu'à une distance de 7 Å de la surface de la protéine pour interagir uniquement avec des molécules d'eau. Cette flexibilité conformationnelle adoptée est décrite par les différents chemins qu'elle suit d'un mutant à l'autre. Il est donc clair que l'aldolase possède une caractéristique importante qui est l'existence de la communication entre le site actif et la partie C-terminale.

4.10 Groupement Sulfate

Dans le mutant E187A, la mutation a impliqué d'importants changements structuraux dans le site actif du tétramère qui ont été transmis aux interfaces entre sous-unités. La structure du mutant E187A montre une conservation des structures secondaires et tertiaires. Les changements observés sont au niveau des positions des C_{α} et de celle des chaînes latérales de plusieurs résidus. Or ces changements ont eu un important impact sur le site du sulfate. C'est la première preuve structurale chez les aldolases de classe I de cette communication entre le site actif, la partie C-terminale et la surface de la protéine. C'est également la communication entre les interfaces des sous-unités du tétramère qui stabilise l'ion sulfate.

4.11 Mutations et l'état de charge des acides aminés de l'aldolase

Dans le cas de E187Q, la mutation affecte l'état d'ionisation de l'Asp-33 qui étant neutre chez l'aldolase native, devient chargé chez le mutant E187Q. La question qui se pose est comment un résidu muté peut avoir un aussi important impact sur l'état de charge et la conformation des résidus situés à 10 Å de celui-ci. La réponse a été obtenue par la détermination expérimentale du pKa de la Lys-107 du site actif. Cette expérience utilise comme chromophore le pyridoxal phosphate qui en se liant à la Lys-107, montre que celle-ci subit un déplacement de son pKa de 3 unités par rapport à l'aldolase native. Ce dernier passe de 7.2 chez l'aldolase native à 10.2 chez le mutant E187Q. En effet, dans la structure du mutant E187Q, cette lysine s'éloigne de l'Asp-33 dans les sous-unités un et trois pour interagir uniquement avec des molécules d'eau. Son pKa devient proche du pKa standard des lysines qui est de 10 (Voet et Voet, 1990). La mutation dans E187Q engendre effectivement un changement de pKa des résidus loin dans le site actif.

La Lys-107 n'est pas le seul résidu à avoir subi un changement de sa conformation. L'Asp-33 situé proche de cette lysine a également un état d'ionisation et une conformation différente de ceux qu'elle a chez l'aldolase native. On suppose que cet aspartate, suite à

son rapprochement de la Lys-146, connaît une diminution de son pKa et devient chargé négativement chez le mutant E187Q. La Lys-107 située proche de l'Asp-33 a également une influence sur sa conformation.

Ce changement de l'état de charge des résidus affecte également le site de fixation de l'ion sulfate cité précédemment ainsi que la position de la partie C-terminale. La détermination des variations des pKa des résidus qui jouent soit un rôle dans la catalyse ou dans la stabilité permettrait d'expliquer ces changements. Pour ce faire, le calcul théorique selon le principe de Poisson-Boltzmann a été réalisé par le programme Delphi (Sharp et al., 1989). Selon cette théorie, chaque mutant est considéré comme une entité constante par rapport à l'enzyme native et le seul changement subi dans le mutant et celui du résidu muté. Ce type de calcul réalisé dans le cas de la subtilisine permet de calculer le déplacement de pKa des résidus proches dans le site actif qui sont affectés par une double mutation (Gilson et Honig., 1988). Or dans le cas de l'aldolase du muscle de lapin, les structures 3D des mutants déterminées montrent des variations conformationnelles qui même, si elles sont faibles dans certaines régions ou importantes dans d'autres, sont localisées dans toute la structure. Ceci montre que suite à ce changement conformationnel global qui affecte les états d'ionisation des mutants K229M, E187A, E187Q et K107M, la variation de pKa des résidus ne peut être due uniquement à la mutation et ne peut donc être calculée par cette méthode.

L'aldolase est donc une protéine dont l'état de charge du site actif module celui de toute la structure. Il est donc clair que l'implication de la partie C-terminale dans l'activité catalytique se fait à travers une communication électrostatique entre le site actif et la partie C-terminale.

4.12 Modèle proposé du mécanisme enzymatique de l'aldolase du muscle de lapin

L'ensemble des résultats obtenus par la présente étude nous permet d'établir clairement le rôle de certains acides aminés lors de certaines étapes de la catalyse de l'aldolase de muscle. Nous allons donc proposer, dans les six démarches suivantes, un modèle plus complet du mécanisme décrit dans la figure 55 :

- La première étape est l'attaque de la Lys-229 sur le carbonyle du substrat FBP (Lys-229 et Asp-33 neutre).
- La seconde étape est la formation de la carbinolamine. Le Glu-187 est candidat dans cette étape.
- L'étape suivante est la déshydratation de la carbinolamine qui conduit à la formation d'une base de Schiff protonée qui va aider la réaction de clivage en agissant comme un attracteur d'électrons. Cette étape, nécessite un donneur de proton (Lys-146). *on molécule d'eau*
- La quatrième étape est l'abstraction du proton du carbone C₄ suivie du clivage de la liaison C₃-C₄. La Lys-146 polarise l'hydroxyle O₄ pour faciliter l'abstraction du proton par le Glu-187 et stabilise sa charge négative. Après l'arrachement du proton du groupement O₄, la liaison de C₃-C₄ devient instable et sa rupture conduit à la formation du DHAP et du G3P qui est libéré.
- La cinquième étape est la protonation de l'énamine. L'effet stéréoelectronique de la capture de l'hydrogène par l'énamine

démontrée par l'échange isotopique de l'hydrogène pro-S se fait grâce à l'Asp-33 qui stabilise le DHAP. La Lys-146, est responsable de la stéréochimie de cette réaction.

- La dernière étape est la formation du carbinolamine via la capture par le carbone C₂ d'un groupement hydroxyle pour procéder à la libération du produit le DHAP.

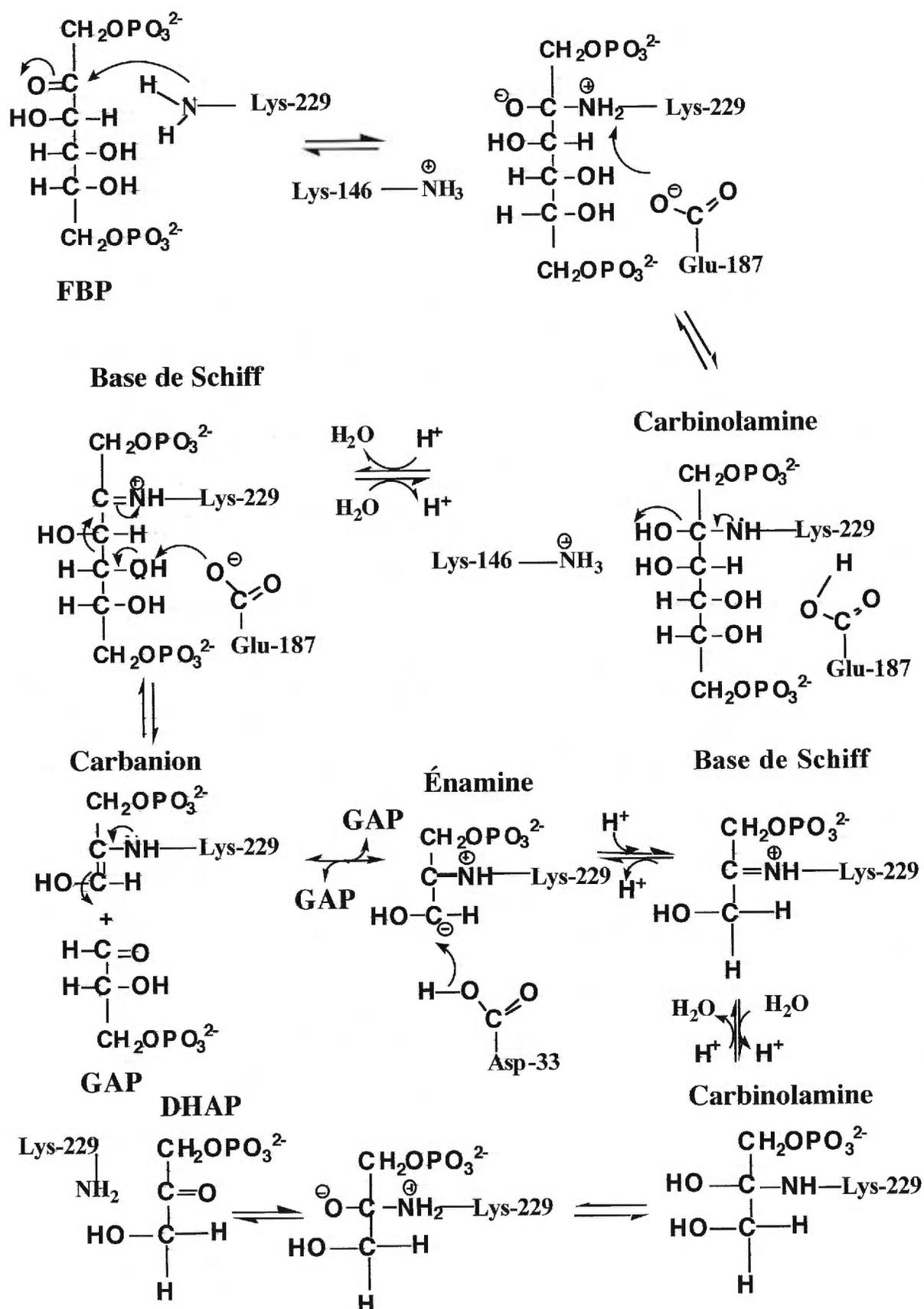


Figure 55 : Mécanisme enzymatique proposé dans le cas de l'aldolase de classe I.

La cristallographie sera un facteur important qui permettra une vision directe et une analyse détaillée au niveau moléculaire de l'aldolase avec son substrat, le FBP, et certains de ses inhibiteurs cités auparavant. Dans ce but, plusieurs expériences de cristallisation ont été entamées. Dans le cas de l'hexitol-1,6-bisphosphate, même si on a pu obtenir des cristaux de complexe, il s'est avéré que la structure ne possède pas d'hexitol-1,6-bisphosphate dans son site actif. L'absence de ce dernier est due à plusieurs raisons encore inconnues qui engendrent la déstabilisation du complexe. Parmi ces facteurs, la conformation de la partie C-terminale peut être un facteur important. Dans le cas du FBP et de plusieurs autres inhibiteurs, ces expériences n'ont pas abouti à l'obtention de cristaux du complexe principalement en raison de l'obtention d'un mélange de divers complexes. Dans le cas du complexe enzyme-FBP, la réaction de rétroaldolisation du FBP conduit à la formation d'une population hétérogène de complexes enzyme-FBP, enzyme-DHAP. Pour remédier à ce problème, nous avons proposé une nouvelle technique expliquée ci-dessous :

4.13 Perspectives

Les progrès récents dans le domaine de la cristallogénèse, outil de base de l'étude des complexes de l'aldolase avec certains inhibiteurs, permettent de surmonter plusieurs difficultés techniques que nous avons d'ailleurs rencontrées lors de l'étude des complexes de l'aldolase avec ses inhibiteurs.

La détermination des structures cristallographiques est souvent limitée par l'obtention de cristaux qui diffractent à faible résolution. Dans le cas de l'aldolase du muscle, la cocrystallisation avec le substrat et certains inhibiteurs s'est avérée une étape dont les résultats sont difficilement exploitables. Cependant, l'application de nouvelles techniques de cristallisation, à savoir la cryo-cristallographie, qui connaît un important développement, a permis de surmonter ces limitations (Garman et al., 1996). Les progrès

technologiques dans le domaine cryogénique permettent d'étendre l'utilisation de cette technique et de l'adapter à plusieurs types de protéines et de conditions de cristallisation (Douzou et Petsko., 1974, Hope et al., 1988 et Hartmann et al., 1982).

Cette nouvelle stratégie a été utilisée pour obtenir des complexes de l'aldolase du muscle avec ses ligands (FBP - l'hexitol-1,6-bisphosphate). Sachant que les cristaux des complexes enclenchent la dégradation après un court délai (quelques minutes), ainsi que sous le faisceau des rayons-X, la congélation des cristaux de complexe s'est avérée d'une grande importance. Après optimisation, les conditions correspondantes du cryo-protectant sont : 5% de glycérol, 40%AmS, 100mM TEA pH 7.45 et le temps de diffusion des ligands dans le cristal est de 5 min. Les cristaux congelés permettent d'obtenir un patron de diffraction aux rayons X parfaitement exploitable. L'utilisation de la cryo-cristallisation a permis de résoudre les problèmes liés à la résolution des complexes d'aldolase. Les informations structurales qui en découleront vont permettre une vision directe des interactions entre ligands et résidus du site actif et vont contribuer à l'amélioration de la précision sur son mécanisme enzymatique. Ces résultats seront utilisés dans la conception de nouveaux médicaments et à la synthèse d'inhibiteurs ciblés uniquement contre l'aldolase des parasites.

REFERENCES

Altson II, W. C., Kanska, M. and Murray, C. J. (1996) "Secondary H/T and D/T Isotope Effects in Enzymatic Enolization Reactions. Coupled Motion and Tunneling in the Triosephosphate Isomerase Reaction ", *Biochemistry* **35**,12874-12881.

Anai, M., Lai, C.Y. et Horecker, B.L. (1973) " The pyridoxal phosphate-binding site of rabbit muscle aldolase ", *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 712-719.

Avigad, G. and England, S. (1972)"The covalent binding of D-fructose-1,6-diphosphate to muscle aldolase ", *Archiv. Biochem. Biophys* **158**, 337-346.

Balashov, S. P., Govindjee, R., Imasheva, E. S., Misra, S., Ebrey, T. G., Feng, Y., Crouch, R. K. and Menick, D. R. (1995) "The Two pKa's of Aspartate-85 and control of thermal Isomerization and Proton Release in the Arginine-82 to Lysine Mutant of Bacteriorhodopsin ", *Biochemistry* **34**, 8820-8834.

Banerjee, P. C., Darzins, A. and Maitra, P. K. (1987) "Gluconeogenic Mutations in *Pseudomonas aeruginosa*: Genetic Linkage between Fructose-bisphosphate Aldolase and Phosphoglycerate Kinase ", *Journal of General Microbiology* **133**, 1099-1107.

Barbas, F. C., Heine, A., Zhong, G., Hoffmann, T., Gramatikova, S., Björnstedts, R., List, B., Anderson, J., Stura, E. A., Wilson, I. A., Lerner, R. A., (1997) " Immune Versus Natural Selection : Antibody Aldolases with Enzymatic Rates But Broader Scope ", *Science*, **278**, 2085-2092.

Beernink, P.T. and Tolan, D. R. (1992) " Construction of a high-copy 'ATG vector' for expression in *escherichia coli* ", *Protein Expression and purification* **3**, 332-336.

Berthiaume, L., Beaudry, D., Lazure, C., Tolan, Dean. R. and Sygusch, J. (1989) "Recombinant Anaerobic Maize Aldolase: Overexpression Characterization, and Metabolic Implications ", *Archives of Biochemistry and Biophysics* **272**, 282-289.

Berthiaume, L., Loisel, T. P. and Sygusch, J. (1991) "Carboxyl terminus region modulates catalytic activity of recombinant maize aldolase ", *The Journal of biological Chemistry* **266**, 17099-17105.

Berthiaume, L., Tolan, D. R. and Sygusch, J. (1993) "Differential Usage of the Carboxyl terminus Region among Aldolase Isozymes ", *The Journal of biological Chemistry* **268**, 10826-10835.

Bhat, T. N. and Cohen, G. H. (1984) "OMITMAP: An Electron Density Map Suitable for the Examination of Errors in a Macromolecular Model ", *Journal of Applied Crystallography* **17**, 244-248.

Biellmann, J.F., O'connell, E.L., and Rose, I.A. (1969) "Secondary isotope effects in reactions catalyzed by yeast and muscle aldolase ", *Journal of the American Chemical Society* **91**, 6484-6488.

Blom, N. S. and Sygusch, J. (1997) " Product binding and role of the C-terminal region in classe I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase ", *Nature Struct. Biol.* **4(1)**, 36-39.

Blom, N. S., White, A. and Sygusch, J. (1999) " Product substrate and product binding in rabbit liver D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase " Unpublished

Blom, N. S. and Sygusch, J. (1997) "Enhanced electron density envelopes by extended solvent definition ", *Acta Crystallographica* **D54**, 461-466.

Blom, N. S. and Sygusch, J. (1997) "High Resolution Fast Quantitative Docking Using Fourier Domain Correlation Techniques ", *Proteins : Structure, Function and* **27**, 493-506.

Blonski, C., Gefflaut, T. and Périé, J. (1995) " Effects of Chirality and Substituents at Carbon 3 in Dihydroxyacetone-phosphate Analogues on their Binding to Rabbit Muscle Aldolase ", *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **3**, 1247-1253.

Blonski, C., De Moissac, D., Pèrié, J. and Sygusch, J. (1997) "Inhibition of rabbit muscle aldolase by phosphorylated aromatic compounds ", *Biochemical Journal* **323**, 71-77.

Brünger , A. T., Kuriyan, K. et Karplus, M. (1987) " Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics ", *Science*, **235** , 458-460.

Brünger , A. T., Karplus, M. et Petsko, G.A. (1989) " Crystallographic refinement by simulated annealing: application to crambin ", *Acta Cryst.* **45**,50-61.

Brünger A.T., X-PLOR Manual, Version 3.1, (1992) New Haven : Yale University Press.

Caligiuri, M. G. and Bauerle, R. (1991) " Subunit Communication in the Anthranilate Synthase Complex from *Salmonella typhimurium* ", *Science* **28**, 1845-1848.

Callens, M., Kuntz, D. A. and Opperdoes, F. R. (1991) " Kinetic properties of fructose bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei* compared to aldolase from rabbit muscle and *Staphylococcus aureus* ", *Molecular and Biochemical Parasitology* **47**, 1-10.

Cross, N. C. P., Tolan, D. R. and Cox, T. M. (1988) "Catalytic Deficiency of Human Aldolase B in Hereditary Fructose Intolerance Caused by a Common Missense Mutation ", *Cell* **53**, 881-885.

Choi, K. H., Mazurkie, A. S., Morris, A. J., Utheza, D., Tolan, D. R., Allen, K. N., (1999) " Structure of a Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase liganded to its natural substrate in a cleavage-defective mutant at 2.3 Å " *Biochemistry* **38**,12655-12664.

Cowan and Kjelgaard (1991) "programme O", unpublished.

Coutts, S. M. ph.D. Dissertation, (1967) Harvard University. Boston USA.

Creighton E. T., (1980) " Proteins Structures and Molecular properties ", Editions Freeman.

Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A., and Ringe D. (1991) " Structure of the triosephosphate isomérase-phosphoglucohydroxamate complexe an analogue of the reaction pathway " *Biochemistry* **30**,5821-5826.

Demoissac, D., These de maitrise (1995) " Détermination du rôle de résidus clés du site actif dans le mécanisme catalytique de de l'aldolase de muscle de lapin recombinante ", U. Montréal.

Dilasio, A., Trombetta, G., Grazi, E. (1977) " Fructose 1,6-bisphosphate from liver : the absolute configuration of the intermediate carbinolamine ", *FEBS Lett.* **73**,244-246.

Dewan, J. C., Mikami, B., Hirose, M. and Sacchettini, J. C. (1993) "Structural Evidence for a pH-Sensitive Dilysine Trigger in the Hen Ovotransferrin N-Lobe: Implication for Transferrin Iron Release ", *Biochemistry* **32**, 11963-11968.

Donoso, J., Munoz, F., Gracia del vado, A., Echevarria, G., and Bracia Blanco, F., (1986) " Study of the hydrolysis and ionization constants of Schiff base from

pyridoxal 5'-phosphate and n-hexylamine in partially aqueous" *Biochem. J.* **238**, 137-144.

DMDA, communications, " Instrumentation Technology Associates, Inc. (ITA) " Low G 5, No 4, 1994.

Döbeli, H., Trzeciak, A., Gillessen, D., Matile, H., Srivastava, I. K., Perrin, L. H., Jakob, P. E. and Certa, U. (1990) "Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase", *Molecular and Biochemical Parasitology* **41**, 259-268.

Dobryzkycki, P and Kochman, M., (1988) " Fluorescence resonance energy transfer studies on the proximity between lysine-107 and cysteine-239 in rabbit muscle aldolase ", *Biochemica et Biophysica Acta*, **956**, 217-223.

Douzou, P., Hoa, G. H. B., Petsko, G. A. (1974) " Protein crystallography at sub-zero temperatures: lysozyme-substrate complexes in cooled mixed solvents ", *J. Mol. Biol* **96**, 367-380.

Efimov, A. V. (1997) " Structural Trees for Protein Superfamilies ", *Proteins : Structure, Function and Genetics* **28**, 241-260.

Fairlaimb, A.H., Opperdoes, F.R. (1986) " Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells ", (Morgan, M.J., ed.), Plenum Press, New York 183-219.

Ferroni, E., L., Harper, E. T., Fife, W. K., (1991) " Slow reversible inhibition of rabbit muscle aldolase by D-erythrulose 1-phosphate ", *Biochemical and Biophysical Research communications*, **176(1)**, 511-516.

Flechner, A., Gross, W., Martin, W. F., Schnarrenberger, C., (1999) "Chloroplast class I and class II aldolases are bifunctional for fructose-1,6-biphosphate and sedoheptulose-1,7-biphosphate cleavage in the Calvin cycle ", *FEBS. Lett.* **447(2-3)**, 200-202.

Fothergill-gilmore, L. A., Michels, P. A. M. (1993) " Evolution of glycolysis " *Progress in Biophysics and molecular biology* **59**,105-236.

Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T. and Mizumo, H. (1998) "Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose ", *Journal of Molecular Biology* **277(2)**, 393-407.

Galdes, A. and Hill, H. A. O. (1978) "The Proton Exchange of the pro-S Hydrogen Atom at C-1 in Dihydroxyacetone Phosphate and D-Fructose 1,6-Bisphosphate Catalysed by Class-I and Class-II Aldolases ", *Biochemical Journal* **171**, 539-542.

Gamblin, S. J., Davies, G. J., Grimes, J. M., Jackson, R. M., Littlechild, J. A. and Watson, H. C. (1991) "Activity and Specificity of Human Aldolases ", *Journal of Molecular Biology* **219**, 573-576.

Gamblin, S.J., Cooper, B., Millar, J. R., Littlechild, J. A. et Watson, H. C. (1990) "The crystal structure of human muscle aldolase at 3.0 Å resolution ", *FEBS letters*, **262**, 282-286.

Garman, E. F., Mitchell, E. P. (1996) "Glycerol concentration required for cryoprotection of 50 typical protein crystallization solutions ", *J. Appl. Cryst* **29**, 584-587.

Gilson, M., Honig, B., "Total electrostatic energy of a protein", *Proteins*. **4**, 7.

Ginsburg, A. and Mehler, A. H. (1966) " Specific Anion Binding to Fructose Diphosphate Aldolase from Rabbit Muscle ", *Biochemistry*. **5**, 2623-2634.

Grazi E., Trombetta G., (1979) " Fructose-1,6-bisphosphate aldolase from rabbit liver. Reaction mechanism and physiological function " *Eur. J. Biochem.* **100**(1) 197-202.

Grazi E., Pecora C. S., Gagliano R., and Trombetta G. (1973) " Complexes of fructose diphosphate aldolase with dihydroxyacetone phosphate and dihydroxyacetone sulfate", *Biochemistry*. **12** (14), 2583-2590.

Grazi, E., Cheng T., Horcker B.L., (1962) " The formation of stable aldolase-dihydroxyacetone phosphate complex ", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 250-253.

Gross, W., Bayer, M. G., Schnarrenberger, C., Gebhardt, U.B., Maier, T.L., Schenk, H.E.A., (1994) " Two distinct aldolases of class II type in the cyanoplast and in the cytosol of alga *Cyanophora paradoxa* " *Plant Physiol.* **104**, 1393-1398.

Gross, W., Lenze, D., Nowitzki, U., Weiske, J., Schnarrenberger, C., (1999) "Characterization, cloning and evolutionary history of the chloroplast and cytosolic class I aldolases of the red alga *Galdieria sulphuraria* ", *Gene*. **230**, 7-14.

- Gupta, R. K., Hollensyein, R., Kochlar, S., Christen, P. (1993) " Para catalytic self inactivation of fructose-1,6-biphosphate aldolase. Structure of the cross link formed at the active site ", *Eur. J. Biochem.* **214**, 515-519.
- Hampton Research, (1994) *Crystallization research tools*, **4**, No 3.
- Hanahan, D. (1983) " Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids ", *Journal of Molecular Biology* **166**,557-580.
- Hartmann, H., Parak, F., Steigemann, G. A., Petsko, D., Ponzi, R., (1982) "Conformational substates in a protein : Structure and dynamics of metmyoglobin at 80K ", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4967-4971.
- Hartman, F.C. et Brown, J.P. (1976) "Affinity labeling of a previously undetected essential lysyl residu in class I fructose biphosphate aldolase ", *J. Biol. Chem.* **251**, 3057-3062.
- Healy, M.J., Christen, P. (1972) " Mechanistic probes for enzymatic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphoglucanate dehydrogenase ". *Biochemistry.* **12**, 35-41.
- Hester, G., Brenner-Holzach, O., Rossi, F. A., Ctruck-Donatz, M., Winterhalter, K. H., Smit, J. D. G. and Pirotek, K. (1991) "The crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Drosophila melanogaster* at 2,5 Å resolution ", *Federation of European Biochemical Societies.* **292**, 237-242.
- Heyduck, T., Kochman, M. (1986) " Re-evaluation of the role of thiol groups in rabbit muscle aldolase A " *Biochim. Biophys. Acta.* **874**, 365-367.
- Highbarger, L. A., Gertl, J. A., Kenyon, G. L., (1996) " Mechanism of the reaction catalyzed by acetoacetate decarboxylase. Importance of lysine 116 in determining the pKa of active-site lysine 115", *Biochemistry* **35(1)**, 41-46.
- Hope, H., (1988) " Cryocristllography of biological macromolecules : a generally applicable method", *Acta Cryst.* **B44**, 22-26.
- Horecker, B.L., Tsolas, O. et Lai, C.Y.(1972) "Aldolases. P.D. Boyer (ED):The enzymes. Academic Press, New York, **7**, 213-258.
- Hsieh, Y., Guan, Y., Tu, C., Bratt, P. J., Angerhofer, A., Lepock, J. R., Hickey, M. J., Tainer, J. A., Nick, H. S. and Silverman, D. N. (1998) " Probing the active site of

human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143 ", *Biochemistry* **37**(14), 4731-4739.

Humphreys, L., Reid, S. and Masters, C. (1986) "Evidence for the spatial separation of the binding sites for substrate and for cytoskeletal proteins on the enzyme aldolase " *Int. J. Biochem.* **18**, 7-13.

Iyengar, R., Rose, I.A. (1981) " Liberation of the triosephosphate isomérase reaction intermediate and its trapping by isomérase, yeast aldolase and methylglyoxal synthase ", *Biochemistry.* **20**, 1223-1229.

Jones, T. A., Zou, J.Y., Cowan, S. W. and Kjeldgaard, M. (1991) "Improved Methods for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in these Models ", *Acta Crystallographica.* **A47**, 110-119.

Kishi, H., Mukai, T., Hirono, Akira., F, H., Miwa, S. And Hori, K. (1987) "Human aldolase A deficiency associated with a hemolytic anemia: Thermolabile aldolase due to a single base mutation ", *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8623-8627.

Kim, H., Certa, P. Hol, (1998) " Crystal Structure of Fructose-1,6-biphosphate Aldolase from the human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* ", *Biochemistry.* **37**,4388-4396.

Kitajima Y., Takasaki Y., Takahashi I., and Hori K. (1990) " Construction and Properties of Active Chimeric Enzymes between Human Aldolases A and B " *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. **265**, No. 29, 17493-17498.

Komives. E. A, Loughheed. J. C, Zhang. Z, Sugio. S, Narayana. N, Xuong. N. H, Petsko. A and Ringe. D. (1996) " The Structural Basis for Pseudoreversion of the H95N Lesion by Secondary S96P Mutation in Triosephosphate Isomérase ", *Biochemistry.* **35**, 15474-15484.

Kleywegt, G. J. and Alwyn Jones, T. (1996) "Good Model-building and Refinement Practice", in press.

Kokesh, F.C. et Westheimer, F.H. (1971) "A reporter group at the active site of acetoacetate decarboxylase II. Ionization constant of the amino group ", *J. Am. Chem. Soc.* **93** (26), 7270-7274.

Kukita, A., Mukai T., Miyata, T., Hori, K., (1988) " the structure of brain-specific rat aldolase C mRNA and the evolution of aldolase isozyme genes ", *Eur. J. Biochem.* **171** (3), 471-478.

Kuo, D. J., Rose, A. I., (1984) " Chemical Trapping of Complexes of Dihydroxyacetone Phosphate with Muscle Fructose-1,6-biphosphate Aldolase ", *Biochemistry*, **24**, 3947-3952.

Lai, C.Y., Nakai, N. et Chang,D. (1974)"Amoni acid sequence of rabbit muscle aldolase and the structure of the active center ", *Science*, **183**, 1204-1206.

Lane, A. Highbarger and John A. Gerlt (1996) " Mechanism of the Reaction Catalyzed by Acetoacetate Decarboxylase. Importance of Lysine 116 in Determining the pKa of active-Site Lysine 115 ", *Biochemistry*. **35**, 41-46.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton J. M. (1993) " PROCHECK : a program to check the stereochemical quality of protein structures ", *Journal of Applied Crystallography*. **26**, 283-291.

Leatherborrow, R.S. (1992) "Grafit Version 3.0" Erithacus Software Limited, Staines, UK.

Lebherz, H. G., and Rutter, W. J. (1996) " Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in Biological systems ", *Biochemistry*. **8**,109-121.

Lebherz H. G., Leadbetter M. M., Bradshaw R. A., (1984) " Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplast forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase ", *J. Biol. Chem.*259, 1011-1017.

Lee, M. E., Dyer, D. H., Klein, O. D., Bolduc, J. M., Stoddard, B. L. and Koshland Jr, D. E. (1995) "Mutational Analysis of the catalytic Residues Lysine 230 and Tyrosine 160 in the NADP⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase from *Escherichia coli* ", *Biochemistry* **34**, 378-384.

Lebioda, L., Hatada, M. H., Tulinsky, A. and Mavridis, I. M. (1982) " Comparison of the folding of 2-Keto-3-deoxy-6 phosphogluconate Aldolase, Triosephosphate Isomerase and Pyruvate Kinase " *Journal of Molecular Biology*. **162**, 445-458.

Lim, C., Bashford, D. and Karplus, M. (1975) "Absolute pKa Calculations with Continuum Dielectric Methods ", *The Journal Physical Chemistry*. **95**, 5610-5620.

Lobb, R.R., Stokes A. M., Hill, H. A., Riordan, J. F.,(1976)"Afunctional arginine residue in rabbit muscle aldolase ", *Eur J Biochem.* **70**, 517-522.

Loisel, T. P. (1992) " Détermination du rôle catalytic des résidus d'acides aminés présents dans le site actif de la fructose-1,6-biphosphate aldolase de muscle de lapin recombinante ", thèse de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc.

Marsh, J. J. and Lebherz, G. H. (1992) " Fructose-biphosphate aldolases : an evolutionary history ", *Trends. Biochem. Sci.* **17(3)**, 110-113.

Mehler, A. H., (1963) " Kinetic propreties of native and carboxypeptidase altered rabbit muscle aldolase ", *J. Biol. Chem.* **238**,100-104.

Metzler, D. E. (1977) *Biochemistry, the chemical reactions of living cells*, Academic press, New York, USA..

Mildelfort, C. F., Gupta, R.K.,Rose, I. A., (1976) "Fructose-1,6-biphosphate aldolase : isomeric composition kinetics and substrate specificity for the aldolases " *Biochem* **15**, 2178-2185.

Moorhead, G. B.,Plaxton, W., C., (1990) " Purification and caracterization of cytosolic aldolase from carrot storage root ", *Biochem. J.*, **269(1)**, 133-139.

Moorhead. G. B., Hodgson, R. J., Plaxton. W. C., (1994) "Copurification of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and cytosolic aldolase from endosperm of germinating castor oil seeds ", *Arch. Biochem. Biophys.* **312 (2)**, 326-335.

Moris, A. J.. and Tolan, D., R. (1993) " Site-directed Mutagenesis Identifies Aspartate 33 as a Previously Unidentified Critical Residue in the Catalytic Mechanism of Rabbit Aldolase A ", *The Journal of Biological Chemistry.* **268**, 1095-1100.

Moris, A., J.. and Tolan, D., R. (1994) "Lysine-146 of Rabbit Muscle Aldolase Is Essential for Cleavage and Condensation of C3-C4 Bond of Fructose 1,6-Bis phosphate ", *Biochemistry.* **33**, 12291-12297.

Morris A.J., Davenport C. R., Tolan D.R., (199 6)" A lysine to arginine substitution at position 146 of rabbit aldolase A changes the rate-determining step to Schiff base formation ", *Protein Engineering* **9 (1)**, 61-67.

Ng, J.D., Lorber, B., Giegé, R., Koszela, S., Day, J., Greenwood, A., McPherson, A., (1997) " Comparative Analysis of Thaumatin Crystals Grown on earth and in microgravity ", *Acta Cryst.* **D35**, 724-733.

Page, P., (1995) Thèse de doctorat, " Synthèse et étude du mode d'action d'inhibiteurs d'aldolase de classe I; vectorisation de ces inhibiteurs chez le trypanosome par le transporteur du glucose ", U. Paul Sabatier, Toulouse, France.

Palczewski, K., Hargrave, P.A. Folta, E.J., and Kochman, M. (1985) "Affinity labeling of rabbit muscle fructose-1,6-biphosphate aldolase with 5'[p-(fluorosulfonyl)benzoyl]-1, N6-ethanoadenosine ", *European Journal of Biochemistry.* **146**, 309-314.

Patthy, L. and Vas, M. (1978) "Aldolase-catalysed inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ", *Nature.* **276**, 94-95.

Patthy L., V'aradi A., Th'esz J., Kov'acs K.,(1979) " Identification of the C-1-phosphate-binding arginine residue of rabbit muscle aldolase. Isolation of 1,2-cyclohesanedione-labeled peptide by chemisorption chromatography ", *Eur J Biochem.* **99**, 309-313.

Pelzer-Reith, B., Penger, A., Schnarrenberger, C., (1993) " Plant aldolase: cDNA and deduced amino-acid sequences of the chloroplast and cytosol enzyme from spinach ", *Plant. Mol. Biol.* **21**,331-340.

Penhoet, E.E., Kochman, M. et Rutter, W.J. (1969) " Isolation of fructose diphosphate aldolases A,B, and C ", *Biochemistry.* **8**, 4391-4395.

Penhoet, E.E., Kochman, M. et Rutter, W.J. (1969) "Molecular and catalytic propreties of aldolase C " *Biochemistry.* **8**, 4396-4402.

Pratt , R. F. (1976) " Rabbit muscle aldolase catalyzed proton exchange of hydroxyacetone phosphate with solvent " *Biochemistry.* **16**, 3988-3994.

Presta, L. G. and Rose, G. D. (1988) " Helix Signal in Proteins", *Science* **240**, 1632-1640.

Qiu, X., Pohl, E., Holmes, R. K. and Hol, W. G. J. (1996) " High-Resolution Structure of the Diphtheria Toxin Repressor Complexed with Cobalt and Manganese Reveals an SH3-like Third Domain and Suggests a Possible Role of Phosphate as Co-repressor ", *Biochemistry.* **35**, 12292-112302.

Racker, E. (1974) "Spectrophotometric measurement of hexo-kinase and phosphohexokinase activity ", *The journal of Biological Chemistry*. **167**, 843-854.

Ramachandran, G.N. et Sasisekharan, V. (1968) "Conformation of polypeptides and proteins ", *Adv. Prot. Chem.* **23**, 283-438.

Ray B.D., Harper, E.T., Fife, W.K.,(1983) " ¹³C NMR evidence of carbinolamine formation at the active site of an imine-forming aldolase ", *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3731-3732.

Richards, J. P., (1985) "Reaction of Triosephosphate Isomérase with L-Glyceraldehyde 3-Phosphate and Triose 1,2-Enediol 3-Phosphate ", *Biochemistry*, **24**,949-953.

Rose, I. A., Warms, J. V. and Kuo, D. J. (1987) " Concentration and partitioning of intermediates in the fructose bisphosphate aldolase reaction. Comparison of the muscle and liver enzymes " *The Journal of biological Chemistry* **262**, 692-701.

Rose, T. A. and Rieder, V. S., (1957) " Studies on the Mechanism of the Aldolase Reaction ", *J. Biol. Chem.* **231** ,315-329.

Rose, I. A., O'Connell, E.L., (1976) "Sppecificity of fructose-1,6-P₂ aldolase(muscle) and partition of the enzyme among catalytic intermediates in the stady state", *J. Biol Chem.* **252**, 479-482.

Rose, I.A., Warms, J.V., (1985) "Complexes of muscle aldolase in equilibruim with fructose-1,6-biphosphate ", *Biochem*, **24**, 3952-3957.

Rose, I.A., O'Connell, E.L., Mehler, A.H., (1965) " Mechanism of the aldolase reaction ", *J. biol. Chem*, **240**, 1758-1765.

Rutter, W. J., (1964) " Evolution of aldolase ", *Federation Proceedings*, **23**,1248-1256.

Sharp, K. A., Nicholls, A., (1989). *Delphi, Versio 3.0* , Columbia University.

Shapiro, S., Enser, M., Pugh, E., and Horecker, B.L. (1968) " The effect of pyridoxal phosphate on rabbit muscle aldolase ", *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **128**, 554-562.

Smit, P.K., Krhon, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujumoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C.

(1985) " Measurement of protein using bicinchoninic acid ", *Analytical Biochemistry*. **150**, 76-85.

Skrzypczak-Jankun, E., Bianchet, M. A., Amzel, L. M. and Funk Jr, M. O. (1996) " Flash-Freezing Causes a Stress-Induced Modulation in a crystal Structure of Soybean LipooxygenaseL3 ", *Acta Crystallographica*. **D52**, 959-965.

Stura ,E. A., Sutapa G., Garcia-Junceda, E., Chen L., Wong, C, and Wilson I. A., (1995) " Crystallization and Preliminary Crystallographic Data for Class I Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase From *Escherichia coli*: An Application of reverse Screening", *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. **22**, 67-72.

Sygyusch, J., Beaudry, D., and Allaire, M. (1990) " Inactivation of Mammalian Fructose Diphosphate Aldolases by COOH Terminus Autophosphorylation ", *Archives of Biochemistry and Biophysics* **283**, 227-233.

Sygyusch, J. Beaudry D., Allaire, M., (1987) " Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7 Å resolution ", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 7846-7850.

Sygyusch, J., Beaudry, D., (1986) " Preliminary crystallographic investigation of rabbit liver aldolase ", *J. Mol. Biol.* **186(1)**,215-217.

Sygyusch, J., Beaudry, D., (1984) " catalytic activity of rabbit skeletal muscle aldolase in the crystalline state ", *J. Biol. Chem.*, **259(16)**, 10222-12227.

Takasaki, Y., Takahasshi, I., Mukai, T. and Kitsuji, H.(1990) " Human Aldolase A of a Hemolytic Anemia Patient with Asp-128->Gly Substitution: Characteristics of an Enzyme Generated in *E. coli* Transfected with the Expression Plasmid pHAAD128G ", *J. Biochem.* **108**,153-157.

Takasaki, Y., Kitajima, Y., Takahasshi, I., Sakakibara, M., Mukai, T. and Hori, K. (1990) "Structural studies on aldolase isozymes through protein engineering", *Prog. Clin. Biol. Res.* **344**, 935-953.

Takahashi I., Takasaki Y. and Hori K. (1989) " Site-Directed Mutagenesis of Human Aldolase Isozymes : The Role of Cys-72 and Cys-338 Residues of Aldolase A and of the carboxy-Terminal Tyr Residues of Aldolases A and B ", *J. Biochem.* **105**, 281-286.

Thomson, G. J., Howlett, G. J., Ashcroft, A. E., Berry, A., (1998) " The *dhna* gene of *Escherichia coli* encodes a ClassI fructose bisphosphate aldolase ", *Biochem. J.* **331**, 437-445.

Thornburg, L. D., Henot, F., Bash, D. P., Hawkinson, D. C., Bartel, S. D. and Pollack R. M. (1998) " Electrophilic Assistance by Asp-99 of 3-Oxo-Delta5-steroid Isomérase ", *Biochemistry*. **37(29)**, 10499-10506.

Tolan, D.R., Amsden, A.B., Putney, S.D., Urdea, M.S. et Penhoet, E.E. (1984) " The complete nucleotide sequence for rabbit aldolase A messenger RNA ", *J. Biol. Chem.* **259**, 1127-1131.

Tolan D. R., Niclas, J., Bruce, B. D., Lebo, R. V., (1987) " Evolutionary implications of the human aldolase-A, -B, -C, and -pseudogene chromosome locations ", *Am. J. Hum. Genet.*, **41(5)** : 907-24.

Vellieux, F. M. D. A. P., Hunt, J. F., Roy, S. and Read, R. J. (1995) " DEMON/ANGEL: a suite of programs to carry out density modification ", *Journal of Applied Crystallography*. **28**, 347-351.

Vidakovic, M., Sligar, S. G., Li, H. and Poulos, T. L. (1998) " Understanding the role of the essential Asp251 in cytochrome p450cam using site-directed mutagenesis, crystallography, and kinetic solvent isotope effect ", *Biochemistry* **30(26)**, 9211-9219.

Voet and Voet. J. G., (1990) *Biochemistry book*, 426-443, Jhon Wiley & son, Toronto.

Withers-Martinez, C., Carriere, F., Verger, R., Bourgeois, D. and Cambillau, C. (1996) "A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity: crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig" *Structure*. **4(11)**, 1363-1374.

Yankeelov (1968) "A simple trimerization of 2,3-butenedione yielding a selective reagent for modification of arginine in proteins", *J. Am. Chem. Soc.* **90(6)**1664-1666.

Yannish-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) " Improved M13 phage cloning vectors and host strains : Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors ", *Gene*. **33**, 103-119.

Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E. A., Liu, K. D., Knowles, J. R., Petsko, G. A. and Ringe, D. (1994) " Crystal Structure of Recombinant Chicken Triosephosphate Isomerase-Phosphoglycolohydroxamate Complex at 1,8 Å Resolution ", *Biochemistry*. **33**, 2830-2837.

ANNEXE

Crystal Structures of the E187A and E187Q Mutants of D-Fructose 1,6-bisphosphate Aldolase from Rabbit Muscle

by

Amal Maurady, Jurgen Sygusch and Alexander Zdanov

Département de biochimie,
Université de Montréal,
C.P. 6128 Station Centre Ville,
Montréal, Québec
Canada H3C 3J7.

Abbreviations

DHAP, dihydroxyacetone phosphate

G3P, D-glyceraldehyde-3-phosphate

Keywords: Class I aldolase, aldol cleavage, fructose 1,6-bisphosphate, x-ray crystallography

Abstract

The three-dimensional structures of two point mutations, Glu187->Ala and Glu187->Gln, in rabbit muscle D-fructose1,6-bisphosphate aldolase were determined to 2.15 and 2 Å resolution, respectively. Structural comparison between the two mutants and native protein shows significant differences among active site residues and C-terminal regions. Contrary to native structure (¹) neither mutant has product nor substrate bound in the active site. The point mutations result in a decrease in catalytic activity by several orders of magnitude. Interpretation of D₂O solvent isotope effects implicates the presence of a catalytic water molecule observed in Glu187->Ala mutant and consistent with its higher catalytic efficiency compared to the Glu->Gln mutant. Surprisingly, neutralization of the negatively charged Glu-187 residue in the point mutations produces hydrogen bonding between putatively charged lysine residues Lys-146 and Lys-229 both adjacent to Glu-187. Spatial proximity of the lysyl ε-ammonium groups implicates a significant pKa shift by at least one lysine residue. Of the two lysine residues, Lys-229 is responsible for Schiff base formation and is situated in the center of the aldolase β barrel and surrounded by a greater number of hydrophobic residues. Schiff base formation depends on nucleophilic attack by Lys-229 and pKa reduction due to charge neutralization of Lys-229 is consistent with the significant acidic shift observed of the pH activity profile to physiological pH through stabilization of lysine positive charges and implicating a lessor pKa shift by Lys-229 compared to the mutants. Given an observed pKa ~ 8.5 for Lys-146 in the native structure, Lys-229 is uncharged at physiological pH requisite for Schiff base formation.

Introduction

Fructose-1,6-biphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) catalyses the reversible cleavage of D-fructose-1,6-biphosphate (Fru-1,6-P2) into glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP). We distinct two types of aldolases, Class I aldolases, present in higher eukaryotes and form a Schiff base with the substrate and Class II aldolases, present in eubacteria and require bivalent ion. Three-dimensional structures of aldolase available in the literature are the following : The rabbit muscle (^{2,3}), human muscle (⁴), *Drosophila melanogaster* (⁵) and *Plasmodium falciparum* (⁶). This work was done in the aim at understanding the functional role of the residues located in the active site and their implication in the different steps of the catalytic mechanism that is only well known in term of intermediates.

The mechanism of Class I fructose-1,6-biphosphate aldolase leading to the Fru-1,6-P2 cleavage from previous biochemical studies are summarised in figure 1. The first step is the linearisation of the Fru-1,6-P2 which is largely in the isomeric β -furanose species when bound to the enzyme (^{7,8}). The Lys-107 interacts probably with the 6-phosphate of the Fru-1,6-P2 (^{9,10}) and the Arg-52 and Arg-148 interacts with the 1-phosphate of the Fru-1,6-P2 (^{11,12}). The Schiff base formation, starts from a nucleophilic attack on the carbonyl of Fru-1,6-P2 and is carried out with the Lys-229 (¹³). Its leads to the formation of carbinolamine (^{14,15}) which is then dehydrated and forms the imine form of the Schiff base of the Fru-1,6-P2 (¹⁶). The Glu-187 was proposed for this role (¹⁷). The Asp-33 was suggested to be responsible for extraction of the proton from the 4-hydroxyl (¹⁸). The cleavage of the C3-C4 bond leads to the formation of the enamine of DHAP (^{19,20}) and than the glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) formed is released. The enamine is protonated and forms the

Schiff base of DHAP (²¹). The formation of carbinolamine takes place after the attack of one water molecule to the Schiff base (²²) and then following by the DHAP release from the enzyme (²³). From structural and kinetic studies, the residues of active site, Asp-33, Lys-146, Glu-Glu-187, Lys-107 and Ser-271 are all candidates for several of those proton exchange steps (²⁴, ²⁵, ²⁶).

The nucleophilic attack carried out by the Lys-229 is made easier by its unprotonated state. The crystal structure of the muscle aldolase shows that this lysine is separated from the Lys-146 by the Glu-187. In this study, the Glu-187 is substituted by the Gln and Ala respectively. The mutation of this glutamine because of its location supports the hypothesis that these lysines have to be repulsed, when they are mutually or individually protonated. We report here a structural analysis of the differences and characteristics between those mutants and the wild type.

We report also here the conformational changes adopted by the C-terminal regions in each mutant. The interest for the C-terminal tail is in the aim at elucidate their structural changes between the different aldolases, to understand their function and specially because this region is target for the selectivity design of ligand of malarial aldolase (²⁷). The C-terminal tail has a great sequence diversity among species. The conformation of the tail in the human, *Drosophila* and muscle aldolase occludes the access of active site. The structure of the muscle aldolase showed that the conformation of the C-terminal is related to the ligand binding (²⁸). The C-terminal region is also implicated in the selectivity between the substrate the Fru-1,6-P2 and the Fru-1P2 (²⁹). In these current mutant structures, the C-terminal region is fully traced and has different interactions between residues.

Preparation and purification

The construction, over expression and purification of native recombinant rabbit muscle aldolase and site-directed mutants was performed as described elsewhere (³⁰, ³¹).

Activity

The activity is performed using the coupled assay system by following NADH oxidation at 340 nm (³²).

Crystallization and X-ray Diffraction Data Collection

The mutant E187A was crystallized in microgravity with MDA method (³³) in 43% of Ammonium sulfate and 5 mg/ml concentration of protein. The first mixing solution was at 50% AmS. The mutant E187Q was crystallized by batch method described by (³⁴). The Crystals from these mutants are monoclinic with the maximum size about 1.2 x 0.8 x 0.2 mm, the space group is P_{21} . The unit-cell parameters and crystal data are summarized in Table 1. All data are collected from a single crystal using a Siemens X-100 multiwire detector mounted on a rotating anode generator. The reduction of data are performed with XGEN data reduction package (³⁵). The crystals of the mutants and the wild type are isomorphous and the structures are solved by simple difference Fourier methods.

Structure Refinement

Coordinates from the structure of the muscle aldolase is refined at 1.9 Å and used to initiate refinement. All solvent molecules, DHAP and C-terminal tail are removed from the model of the wild type. The Rfree value is calculated on 8% of the initial data. All refinements, map calculations and geometric analyses are carried out with X-PLOR version 3.1 program package (³⁶). The initial model was subjected to rigid-body refinement by X-PLOR resulting in an Rfactor for the E187A and E187Q of 39% and 32% respectively. This is followed by several round of simulated annealing (³⁷) to remove bias which may be present from the earlier model. Each system was initially heated to 3000K and slowly cooled to 300K in 500 steps with 0.5 fs time step. The interval of resolution in the starting model first stage is 8 - 2.5 Å. The

higher resolution data were gradually added in a cycles of refinement. Electron density maps are calculated with structure factor coefficients $2|F_o| - |F_c|$ and $|F_o| - |F_c|$. Computer modeling was performed using the program package O⁽³⁸⁾. Model is built after every cycle of refinement and residues was checked with the program OOPS⁽³⁹⁾. Water molecules are gradually included. The building of water structure is carried out after each refinement cycle. They are selected from spherical peaks greater than 2.5 sigma of $|F_o| - |F_c|$ electron density map with unitary occupancy. Initial electron density map shows weak density for the C-terminal sequence (residues 344-363) which is ameliorate with the method of solvent extended definition⁽⁴⁰⁾. The final map showed clear electron density for all the tetramer and water molecules and the final refinement statistics are summarized in Table 2. The mutant E187A has the Lys-146 and 229 that have multiple conformations chain with 0.5 occupancy.

Quality of the Model

The geometrical quality of the refined structure is given by the root mean square (rms) deviations from ideal bond lengths and angles. The program PROCHECK⁽⁴¹⁾ was used to check the geometry of the protein and Ramachandran plots was used to verified if the final model was satisfactory and are summarized in Table 2.

RESULTS AND DISCUSSION

Activity

The single mutation at the Glu-187 resulted in enzyme with low activity. The E187A and E187Q have a perturbation of the rate of Schiff base formation and displayed considerably lowered activity towards Fru-1,6-P2. The pH dependence of the Fru-1,6-P2 cleavage activity was assayed over the pH range 5 – 10 and the variation of the activity via the pH show that the pH optimum is pH 6.5 and 5.7 and a catalytic efficiency at pH 7.0 is reduced by 300 fold and 3000 times for the E187A and

E187Q respectively than the wild type aldolase. They are a shift in the acid part (Figure1). However the K_m for this substrate was unchanged. The specific activity in D_2O is similar of both mutants and can be explain if a water molecule can carry out the proton transfer step ordinarily performed by Glu-187. The background is determined by the K229M mutant, where the effect of cleavage of the Fru-1,6-P2 is 10^6 time less than the wild type as shown in Table3.

Structural analyses

The overall fold of those mutants monomer are an $(\alpha/\beta)_8$ barrel as seen in the wild type. The Structural comparison of the structure of the mutant E187A and E187Q and the wild-type show that the rms deviations of equivalent C_α atoms among subunit of the tetramer in the unit asymmetric are 0.7 and 0.27 Å respectively when C-terminal regions were excluded (Figure 2,3). The side chains in subunit interfaces is virtually identical. The superposition of those structures shows significant variation between theirs C_α that is summarized in Table5. Conformational differences among tetramer subunits were at the level of the residues of the active site and relative C-terminal regions. However, the density for amino acids 344 through 363 in the earlier map is poor, after refinement and extension of solvent this region has a clear and interpretable electron density shown in Figure 4. The high temperature factors (B-factors) of the C-terminal region are an indicator of its flexibility in a molecule and specially for the residues, that are exposed to the solvent and have B_{moy} of 40 Å².

E187A mutant

Active site region

The mutation of the Glu-187 into an alanine having a much weaker vdw radius led to rearrangement of the residues of the active site. Thus, establishing a new ionic connection or a hydrogen bond or hydrophobic contacts with an aim at filling the space formed by this cavity to acquire the best or a better stability. The comparison

of the structure of the native and the E187A mutant leads at the following establishment :

Subunit 1. The side chain of the Lys-229 has the most conformational change and has turned its Nz towards their proper carbonyl group. This make it more accessible to the cavity created by the mutation. The Lys-146 adopts two different side-chain conformations. In one of them, it is rotated by a $\sim 60^\circ$ around its C α -C β bond to interact with the Lys-229. Both of those lysines bind to the water molecule. The short inter atomic distance of 2.9 Å between their amines is significant and is consistent with a reduced pKa of one of them which is no protonated. In its second conformation, the Lys-146 is directed towards the Asp-33 as in the wild type. The Val-150 has also a conformational change towards the Lys-229, which leads to keep of its hydrophobic interaction.

Contrary to the wild type, the Arg-148 underwent a rotation of 45° starting from the carbon C δ and more oriented to the interior of the active site to interact with the Glu-189. This ionic interaction holds the Arg-148 in an adequate position and ionic state to recognize the 1-phosphate (⁴²) and particularly to avoid a steric bulk in the active site in the presence of the substrate or product. The Lys-107 interacts only with the carbonyl group of the Asp-33 and is directed outside the active site. This conformational change was observed in all the active sites of the mutant tetramer.

Subunit 2. The lysine 146 adopt multiple side chain conformations that are also different from the other subunits. In the first conformation, the Lys-146 Nz makes a $\sim 90^\circ$ rotation around its C δ -C ϵ forming a hydrogen bond to the Lys-229 Nz and the distance between their Nz is 2.5 Å. In the second conformation the Lys-146 is oriented towards the Asp-33 and Asp-109 and the side chain of the Lys-229 undergoes a rotation of $\sim 90^\circ$ around its C δ -C ϵ bond the Ser-300 and both of them are in the similar conformation in the native ($d(\text{O}_\gamma\text{-N}_\epsilon) = 3.4 \text{ \AA}$). The distance between the Nz of those two lysines in this second case is 5.5 Å as shown in figure 4. Those

two conformations can only be possible if one of the lysines or both of them have a different ionization state. The Glu-189 is much more oriented toward the Arg-148 holding the ionic state and interaction between them. The Arg-148 is probably positively charged to facilitate their interaction with the 6-phosphate dianion. Another residue Glu-34 that has significant change, making a $\sim 90^\circ$ rotation around its C_β - C_γ into the active site. Its carboxylic group compensates the lost of the one of the Glu-187 mutated and can contribute to keep the same charge repartition to ensure their catalytic efficiency.

Subunit 3. The Lys-229 and 146 Nz are distant by 4.7 Å rather than 5.16 Å in the native. The Lys-146 had the most important conformational change compared to the Lys-229. Its conformation is towards the Asp-33 ($d(\text{Nz}-\text{COOH})= 3 \text{ \AA}$). The Lys-229 Nz interact with the Ser-300 and a water molecule. The other residues of the active site have only a few changes.

Subunit 4. Lys-229 had two different sides chains conformations. The Lys-229 moved towards the Lys-146 to occupy the space created by the mutation. Their ammonium group is close together by 4.19 Å instead of 4.9 Å in the wild type.

Residues in the access of the active site

The residues in the access of the active site have also different conformations from the wild type and mainly the two arginines 42 and 303. The Arg-42 folds into the active site to have a hydrogen bond with Glu-34 in a similar conformation to the wild-type, while the Arg-303 fold outside the active site and had a $\sim 60^\circ$ rotation around C_α - C_β directed towards the Arg-42, in the opposite direction from the Gly-273. However it still keeps its interaction with the Glu-354. The Arg-303 still keeps its ionic link with the Glu-345 even if they both underwent rather than some significant displacements of its C_α 5 Å compared to the wild type. The Arg-303 and

42 remain antiparallel, distant by 3.6 Å. In the subunit 2 the Arg-303 undergoes inside the active site because of the hydrogen bond with the Ser-271. This serine had moved by 2.7 Å towards the Arg-303, which the Ca also had move by 1.6 Å towards the Ser-271 to make them close. The Arg-303 is at 4.6 Å from the Arg-42, which does not have a conformational change. In subunits 3 and 4, the Arg-42 has a strong conformational change and is oriented towards the exterior and the Arg-303 inside the active site. The Arg-303 was translated to become antiparallel to the Arg-42 and is oriented inside the active site. They are staked together and their Nz are about 2.8 and 3.3 Å Nz in the subunit 3 and 4 respectively. This distance enhance their conformational stability and decrease their pKa.

COOH terminal region. From the subunit 1 to 4 the C_α of this region has changed by 5, 4, 2.5 and 2.4 Å respectively. In the subunit 1 and 2, this region has different side chain conformations and also interactions with the rest of the structure. However it keeps its proximity towards the access of active site. In the subunits 3 and 4 they are only a few change.

New water molecule. In the 4 subunits of the tetramer of the E187A, the cavity created by the mutation has a favorable binding site for a water molecule. It is located at a distance, which is between 1.2 to 2 Å from the carbonyl group of the Glu-187 mutated. This new water molecule interacts with the carbonyl of Glu-189 and the Nz of Arg-148 which probably helps to orientate the nucleophilic water for the perfect proton exchange (Table 3). This mutant gives a structural explanation of the specific proton transfer reaction with DHBA-P⁽⁴³⁾.

Mutant E187Q

Active sites. In this mutant, the lateral chain of the Glu-189 has moved towards the carboxylate group of the mutated residue Gln-187 to make a hydrogen bound at 2.7 Å distance rather than 3.7 Å in the Wild type. The proximity of those residues

became possible as a result of the neutralization of the charge of Glu-187 mutated to a Gln and the mutant shows clearly the presence of negative charge of the Glu-187 in the wild type. In this mutant, the Lys-229 and Lys-146 have different interactions in each subunit of the tetramer. In the subunit1, Lys-229 is more oriented to the C_ϵ of the Lys-146 (3.1\AA) rather than to their N_z (4.7\AA). In subunits 2, their N_z are separated about 5\AA . In the subunit 3 those residues have the same conformation in the wild type. In subunit 4 the Lys-229 have their N_z are separated by 2.94\AA respectively. The lost of the interaction between the Glu-187 and Lys-146 make it more oriented towards the Asp-33 to be stabilized by its ionic interaction. In this mutant, the Lys-107 doesn't have a conformational change.

In the access of the active site residues, the Arg-303 and Arg-42 display different side chain conformations. The Arg-303 folds into the active site while Arg-42 folds outwards, thereby forming a stacked arrangement with each other to become antiparallels in the subunits 1 and 2. In subunits 3 and 4, Arg-303 has a great changes in the opposite direction of the Arg-42 toward the Ser-275 making the accessibility of the active site more bigger than the wild type.

C-terminal region. The C-terminal region has a more orderly secondary structure than the wild type. In the subunits 1 and 2 this region interact differently with the rest of the structure. The C-terminal tail has more heliptic shape for the residue from 344 to 356 of the subunit 1 and at the end for the subunit 3. In the subunit 1 there is a lot of difference in the C-terminal conformation and mainly between the that have now a heliptic shape. The helix increases the conformational stability of this part and leads to the compact conformation. These structural changes induce different position of the Glu-354, which is far from the one in the wild type by 6.84\AA , and the lost of its interaction with the Arg-303. In the subunit 2, the C-terminal region is more oriented to the interior of the active site and their interaction with the rest of the structure is conserved. In the Subunit 3, the C-terminal region has more different conformations

than the other subunits mainly from the residue Pro-344. This region became more nearer the entrance of the active site by the rotation of 45° from the Pro-344, than the wild type. These different conformations are related to the change in the interactions between the C-terminal residues and those of the 2 helices formed by the residues (35-46, 303-318).

Discussion

To discuss the importance of pKa decreasing in aldolase mechanism, we report that in the mutant E187A, the Lys-229 and the Lys-146 are proximal, thereby lowering their respective pKa and can also facilitate the proton transfer steps. The mutation affects the change of the conformation of the Lys-146 more than the Lys-229. The Lys-146 has a different conformation compared to the others lysines and is related to its ionic state. The lysines 146 and 229 adopt different side chain conformations in some subunits. The Lys-229 has a partially hydrophobic environment that favored the lowered of their pKa. In the wild type, the Lys-146 has a pKa value consistent with its alkylation by N-bromoacetyethanolamine phosphate that occurs at pH 8.5⁽⁴⁴⁾. This supports its ionic interaction with the Asp-33⁽⁴⁵⁾.

The proximity between the Nz of the Lys-229 and the C_ε of the lys-146 of 2.8 Å in the subunit 1 and 2 suggests that the Lys-229 is probably in the neutral form and this hypothesis can be supported by their Nz proximity in the other subunits (2.8 and 4.1 Å) (Figure 5). This data supports the Westheimer hypothesis for the Acetoacetate Decarboxylase enzyme also proceeding via the formation of a Schiff base intermediate and where the proximity of Nz two lysines in the active site decrease their pKa. This hypothesis can be applied in the case of those mutants of aldolase. This results support that the Lys-229 doesn't transfer his proton before the Schiff base formation with the substrate at pH 7 but is probably unprotonated. This structural data is supported by some kinetic data in which the pKa calculated from the specific activity of the mutant E187A and which is 5.83/6.53 rather than 5.09/10.36 in the

native. This data shows also that the perturbation of the pKa of the lysine residues in the active site can be implicated in the catalytic mechanism. The multiple conformations of the Lys-146 with the one nearest of the Lys-229 can be related to its different ionic state or simply to the bigger space created by the mutation giving more flexibility to this residue. Consequently, after the neutralization of the Glu-187, the proximity of those lysines lowered their pKa and makes easier the nucleophilic attack of the Lys-229 and the proton exchange in the enzymatic reaction of the Lys-146 when the Lys-229 and/or the lys-146 are in the neutral form.

Water Molecules Take Over the Role of The Glu-187

The crystal structure of the mutant E187A shows a structural confirmation of a water molecule that fits into the active site, in the cavity created by the mutation and interacts with both the Glu-189 as shown on Figure 6.

This single water molecule, could carry out the proton transfer steps in the mechanism ordinary performed by the Glu-187 and that are seen in the case of D₂O. The observation of these catalytically important water molecule is also consistent with the observation that the DHAP is more stabilized in the E187Q rather than in the E187A (⁴⁶.. However, the proton transfer is more favored in the presence of the water molecule in the E187A.

Others Structural changes

The change of the lateral chain of the Val-270 in subunit 1 and the Val-150 in subunit 2 keep their hydrophobic interaction with the Lysine 229 and 146 respectively and are in agreement with the change of those lysines to lowered their pKa.

Theses two arginines are parallels in subunits 2 and 4 or antiparallels in subunits 1 and 3 and the distance between their amino group in the tetramer are 3.31, 4, 2.95 and 3.7Å in the subunit 1, 2, 3 and 4 respectively. The difference of the conformational changes in the subunits 1 and 2 of the Arg-303. They led to an open

access of the active site. This can be assisted by opening up the cleft giving to the substrate an easier accessibility and for the DHAP more facility to be released that is a slow step in the muscle aldolase (⁴⁷). In spite that the purification and crystallization of those mutants are similar to native one, we don't have the DHAP in the mutant active sites. The absence of DHAP is deeply related to the conformation of the C-terminal region and the conformation of the Arg-42 and 303 which stabilize the 1-phosphate of the DHAP in the subunits 1 and 2 (⁴⁸).

Structural Consequences of the Mutant E187Q.

The capacity to participate in a hydrogen bond formation is similar in the carboxylate of the Glu-187 and the carboxamide of the Gln-187 (⁴⁹), but the incapacity to participate in a proton transfer leads to the significant decrease in activity (table 3).

The structural analysis of the E187Q mutant confirms the negative charge of the Glu-187. The postulated mechanistic role of the Glu-187 as a general acid to transfer a proton to carbinolamine intermediate which is required in the dehydration step at neutral pH is more supported by its negative charge. In this mutant, we have the same proximity of the Lys-229 and 146 observed previously in the E187A and the distance between their Nz are between 2.8 to 4 Å, which is about 1 to 2.2 Å less than the wild type (Figure 7). Although we have a conformation variability of these two Lysines upon the subunits of the tetramer as seen in the E187A mutant, which supports the hypothesis that we postulated for neutral form of the Lys-229 and or the Lys-146.

Access of the active site has a great change. In the subunits 1 and 2 only the Arg-303 has a conformational change towards the Arg-42 and they become staked together. In the subunits 3 and 4, the Arg-42 and 303 had mutually an important conformational change. The Arg-42 has moved outside in the direction of the Arg-303 that moved inside the active site, their Nz was at 2.77 to 3.3 Å lowering their pKa. The different conformations of the residues in the access of the active site Arg-

303 and 42 and those of the C-terminal regions that are at the surface of the active site support the hypothesis that they can affect probably the capture of the DHAP in the active site.

C-terminal regions. The residue 344 is a proline by sequencing as well as in the wild type as in the mutant (data not shown). The structural data shows that this residue is a serine in the wild type (⁵⁰) and a proline in the mutant. This difference has a great influence in the orientation of the subsequent poly-ala loop residue (349-356) of the C-terminal, which is characterized with a great flexibility and is oriented differently.

In the E187Q mutant this region has much more differences from the wild type than in the E187A. Then, the C-terminal region (residue 343-363) of aldolase have considerable mobility and are not only related to active site binding as it was thought (⁵¹). This was moreover observed in the mutant K229M in which the active site does not have a significant difference from the wild type but the C-terminal region, have nevertheless also a different conformation (data unpublished).

In the E187A mutant, the C-terminal region is in different position but has the same folding except for the subunit 1 and 3 which has more helical shape. The conformational change of the C-terminal region is only in the subunits 1 and 2 and the helix (residue 303-318) and are the consequence of the change in the interactions between the residues Lys-311, Ser-308 and Gln-306 and those of the C-terminal region. They seem to be the principal reason of this conformational change and prove that the C-terminal tail can adopt different conformation as well as stability . This tendency of this region to adopt a more heliptic structure is present more in the mutant E187Q than the E187A, which has a more orderly C-terminal region. The C-terminal region of the aldolase adopts different conformations, which is not specially related to the active site mutation. These conformations sees to be energetically favorable. The changes of the C-terminal region even they are

important don't be assigned to this characteristic non catalytic region where only the Tyr-363 is implicated in the proton abstraction necessary to the cleavage (⁵²).

Site of binding of Sulfate.

The two binding sites are absent on the E187A but not in the E187Q mutant where those sites are identical to the native one. The sulfate has two binding sites and is stabilized by the interaction with the Lys-12, Lys-119, Arg-258 and Gln-202 of the adjacent subunit and a water molecule as shown in figure 7. These residues have a similar conformation between the mutant E187Q and the wild type. However in the mutant E187A, we report the absence of the interaction of the Lys-12 of the subunit 1 in the first site and the one of the Lys-119 of the subunit 2 in the second site. Those subsequent conformational changes of the Lys-199 and the Lys-12 are related to the abolition of the sulfate binding site and are a consequence of a main change of the interaction between monomers. We conclude that the stabilization of the dibasic binding site has to be through the simulating interaction of those fourth residues and their non specific implication in the stability of the protein.

Conclusion

The evidence of negative charge of the carboxylic group of the Glu-187 in the wild type was demonstrated by the structural analyses of the E187Q mutant. This ionic state might facilitate the proton abstraction from the 4-hydroxyl of the substrate related to its proximity and which can be followed by the cleavage and the production of the enamine DHAP and the G3P.

The Lys-229 and 146 of the active site of the aldolase adopt the spatial proximity between their Nz not only because of the cavity created by the E187A but also in the mutant E187Q. This structural characteristic was observed in both mutants E187A/Q are a consequence of the neutralization of the Glu-187 and leads mainly to decrease the pKa of the Lys-229 needed to allow the proton transfer and carry out a nucleophilic attack on the carbonyl of the Fru-1,6-P2. The charged state of this Lys-

146 and interaction with the Asp-33 can lead to their proximity to the Lys-229 only if this one is in a neutral form principally in the E187Q mutant, where the Lys-146 are more oriented to the Asp-33 keeping its ionic interaction.

The neutral form of the Lys-229 or Lys-146 in this mutant is a consequence of the capture of a proton by the Glu-187 which can occur at different steps of the catalysis. This is supported by the proximity between the Glu-187 more towards the Lys-146 rather than the Lys-229.

The structural confirmation of the catalytic water molecule in the cavity created by the mutation, which is perfectly positioned for the proton exchange steps in the catalytic mechanism.

Table 1 : Crystal data

Crystallographic Data	Mutant E187A	Mutant E187Q
Space Group	P ₂₁	P ₂₁
a(Å) b(Å) c(Å)	165.968 58.364 86.954	164.32 , 57.51 , 85.36 ,
β(°)	103.164	102.66
Asymmetric unit	tetramer	tetramer
Resolution maximum (Å)	2.15	2
Number of total de reflections	88801	88145
Number of unique reflections	56675	81034
Completeness(%)	81	83
*R _{sym} (%)	7.7	6

* $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl) - \bar{F}_i(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl)|}$, with i over the number of independent observations of reflection hkl.

Table 2 : Refinement statistics

	Mutant E187A	Mutant E187Q
*R _{fac}	17.78	19.14
**R _{free}	22.89	23.3
Interval of Resolution (Å)	10 - 2.2	10 - 2
Number de reflections (F > 1σF)	55143	87623
Number of atomes	17409	17107
Number de molecules of water	3498	3500
R. M. S. Deviation / ideal value		
r.m.s.d. deviation bond (Å)	0.011	0.008
r.m.s.d. deviation angles (°)	1.812	1.678
r.m.s.d. deviation dihedrals (•)	22.1	21.53
r.m.s.d angles improper (•)	1.21	1.445

Table3 :

Protein	kcat/Km (s ⁻¹ μM ⁻¹)	Km (μM)	Specific activity (U/mg) in H ₂ O	Specific activity (U/mg) in D ₂ O
Wild Type	7.7	5.08	12	4.46
E187A	0.0189	6.22	0.044	0.031
E187Q	0.0014	3.39	0.007	0.016

The specific activity was measured in TEA buffer (0.1M TEA-HCL at pH7.0), 0.42mM NADH and coupling enzymes (10μg/ml glycerol-3-phosphate dehydrogenase; 1 μg/ml triose-phosphate isomerase). Aldolase cleavage activity is initiated by the addition of substrate FBP and measured by following NADH oxidation at 340 nm in H₂O and D₂O respectively.

Table 4 : Effect of the mutation of the Glu-187 to the Gln-187 on their interaction with the Lys-146 and 229.

	Wild type				E187Q			
	dSU1 (Å)	dSU2 (Å)	dSU3 (Å)	dSU4 (Å)	dSU1 (Å)	dSU2 (Å)	dSU3 (Å)	dSU4 (Å)
Lys-146/*Res-187	3.71	3.38	4.22	3.72	3.37	3.88	4.18	4.17
Lys-229/*Res-187	4.29	4.26	4.73	4.48	4.16	4.37	4.26	4

dSU : the distance between the Lys-146 and 229 and the Glu-187 in the wild type and the Gln-187 in the E187Q mutant.

*Res -187 : is the Glu-187 in the wild type and the Gln-187 in the E187Q mutant.

Table 5 : The distance between the ϵ -ammonium group of Lys-146 and Lys-229
In the wild type and the E187Q and E187A mutant

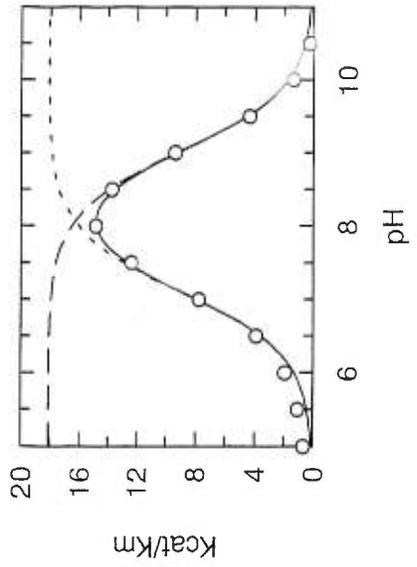
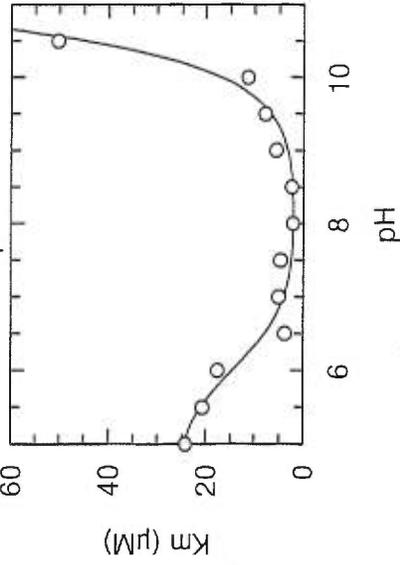
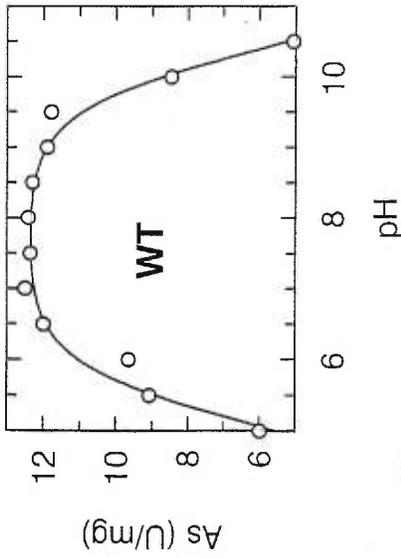
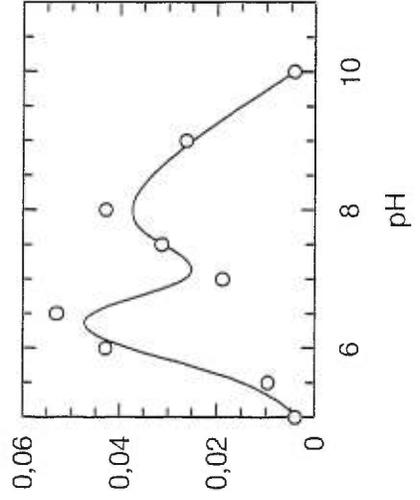
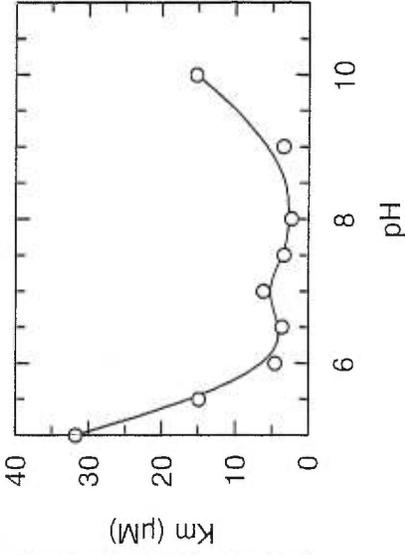
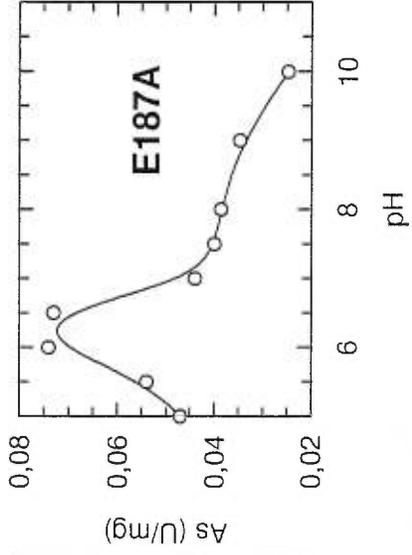
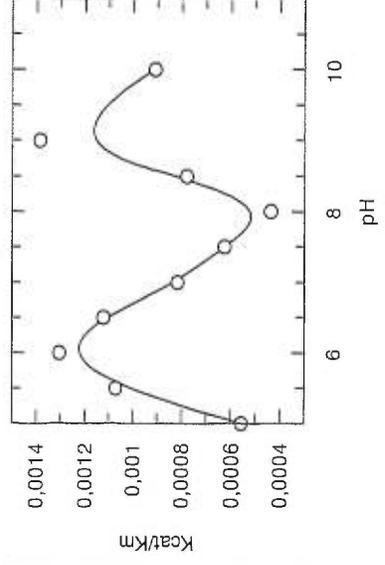
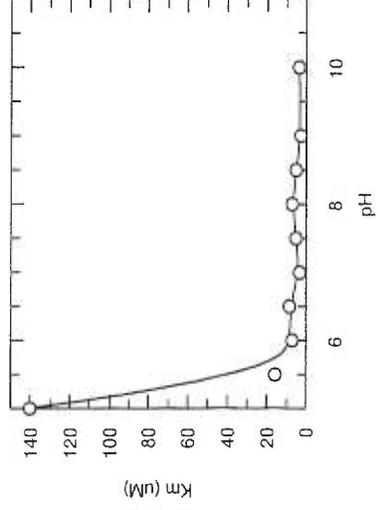
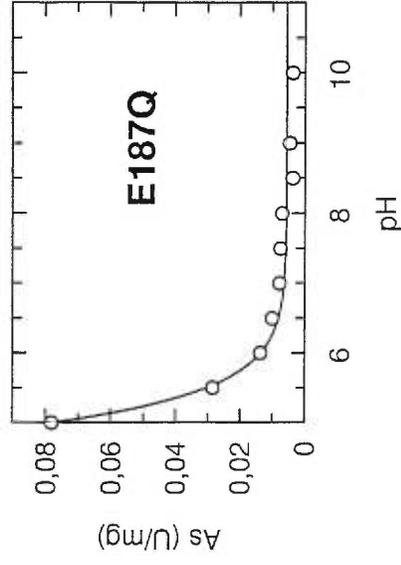
Lys-146/Lys-229	dSU1 (Å)	dSU2 (Å)	dSU3 (Å)	dSU4 (Å)
Wild type	4.96	4.9	4.73	4.91
E187Q	4.61	5	5.07	2.94
E187A	2.62 ^a / 5.34 ^b	2.55 ^a / 5.51 ^b	5.16	4.19 ^c / 5.83 ^d

In E187A mutant they are two conformations a and b of Lys-146 in subunits 1 and 2 and two conformations c and d of Lys-229 in subunit 4. The hydrogen bond between those two lysines is possible in the subunit 4 for the E187Q mutant and the subunit 1 and 2 for the E187A mutant.

Table 6 : Interactions between the lateral chain of the residue Lys-146 and the Asp-33 and Asp-109 respectively in the four subunits in E187A mutant.

E187A	dSU1 (Å)	dSU2 (Å)	dSU3 (Å)	dSU4 (Å)
Lys-146/Asp-33	3.9	3.9 ^b	3.06	3.9
Lys-146/Asp-109	6.75 ^a / 6.39 ^b	6.73 ^a / 2.9 ^b	5.78	4.49

In E187A mutant they are two conformations a and b of Lys-146 in subunits 1 and 2 and two conformations c and d of Lys-229 in subunit 4



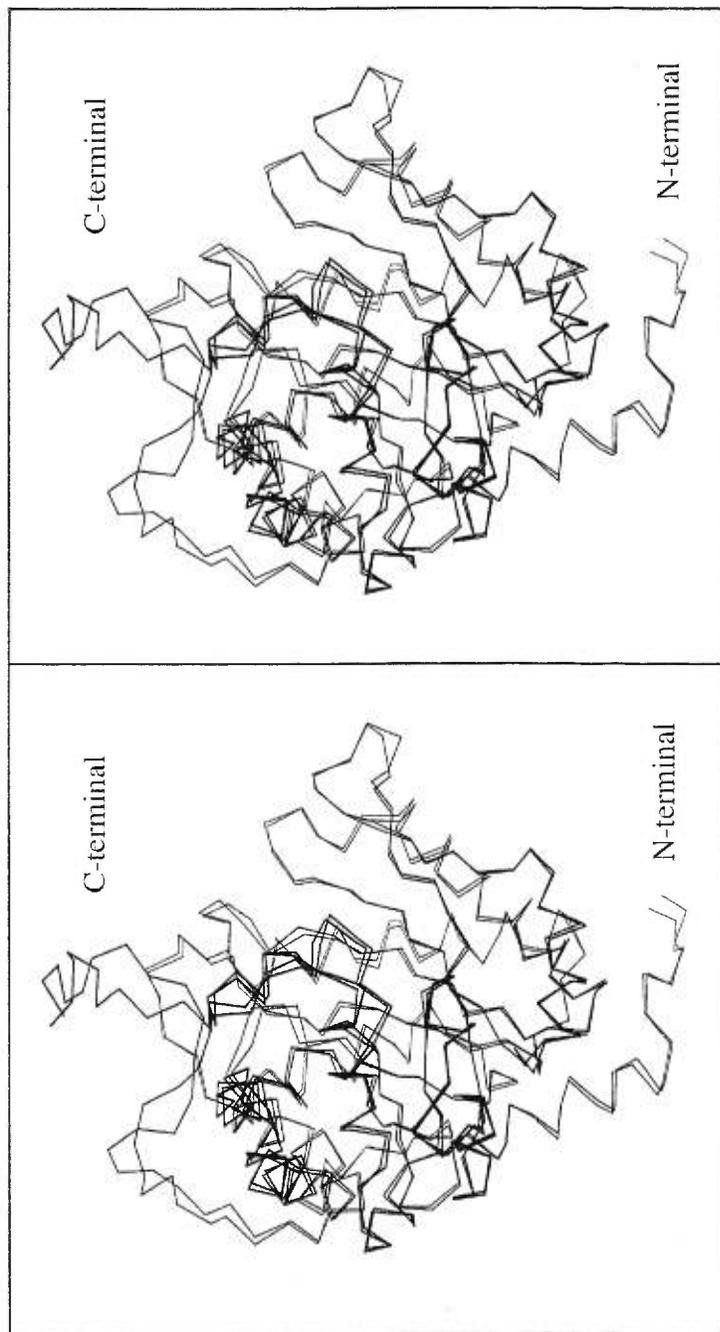


Figure 2 : Stereoview of the superposition of the C_{α} traces of the structure of the rabbit muscle aldolase native and the mutant E187A.

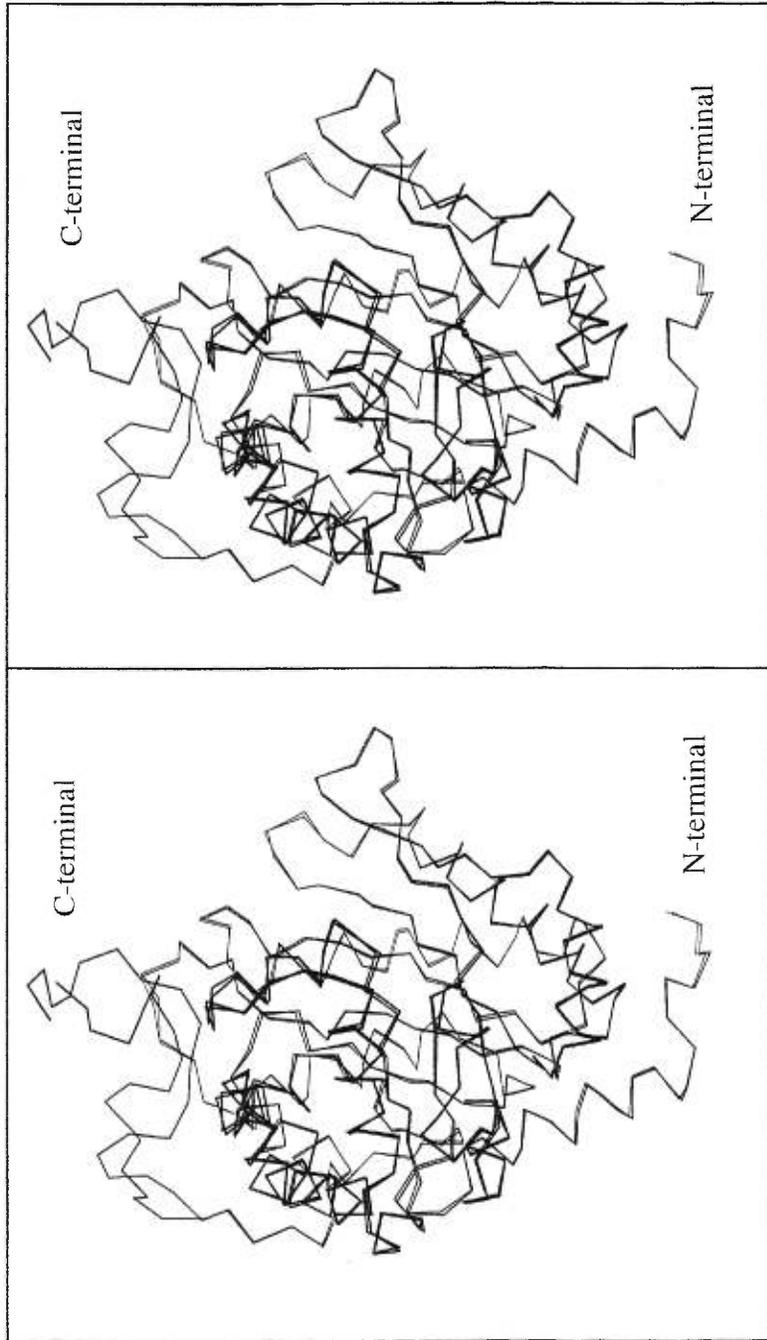


Figure 3 : Stereoview of the superposition of the C_α traces of the structure of the rabbit muscle aldolase native and the mutant E187Q.

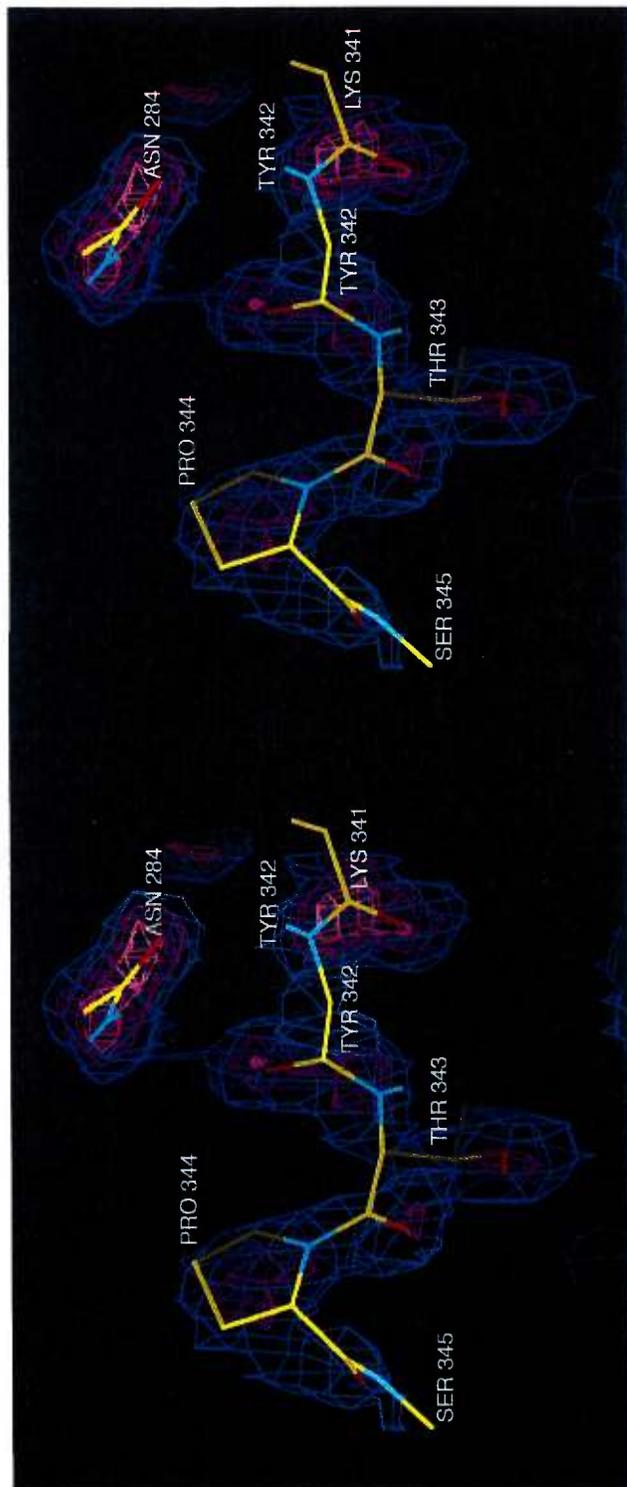


Figure 4 :

Electron-density envelope of an $2F_o-F_c$ electron-density map at 2.2Å resolution for amino acids 341 through 345 in subunit 1 of the E187A rabbit muscle aldolase mutant and contoured at 0.6σ . The electron-density corresponding to structure E187A mutant with solvent molecules selected from peaks exceeding 3σ on F_o-F_c difference map. Final average B factor for residues of COOH terminal region shown was $60 \pm 2 \text{ \AA}^2$. This region has a clear and interpretable electron-density is showing the Pro-344 in those mutant which is a Serine in the wild type .

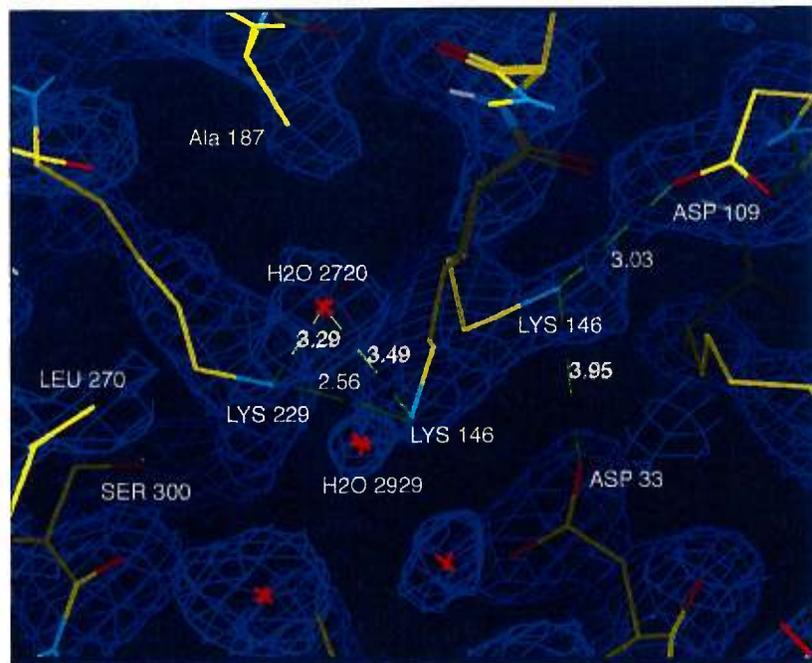
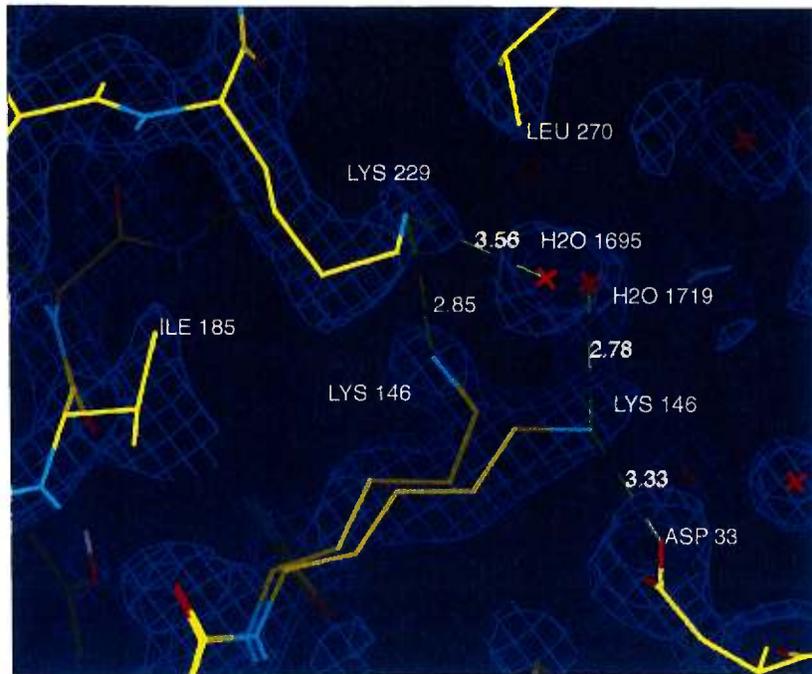


Figure 5 : Stereo view of side chain conformations for residues Lys-229 and Lys-146 observed in subunit 1 and 2 of the mutant E187A of rabbit muscle aldolase. Electron-density envelope was contoured at 0.6σ .

Figure 6 : New water molecule in the cavity created by the mutation of the Glu-187 to an alanine in the subunit 1 of the E187A mutant of rabbit muscle aldolase. This water molecule has the interaction with the Glu-189 and the Arg-148. Electron-density envelope was contoured at 0.6σ .

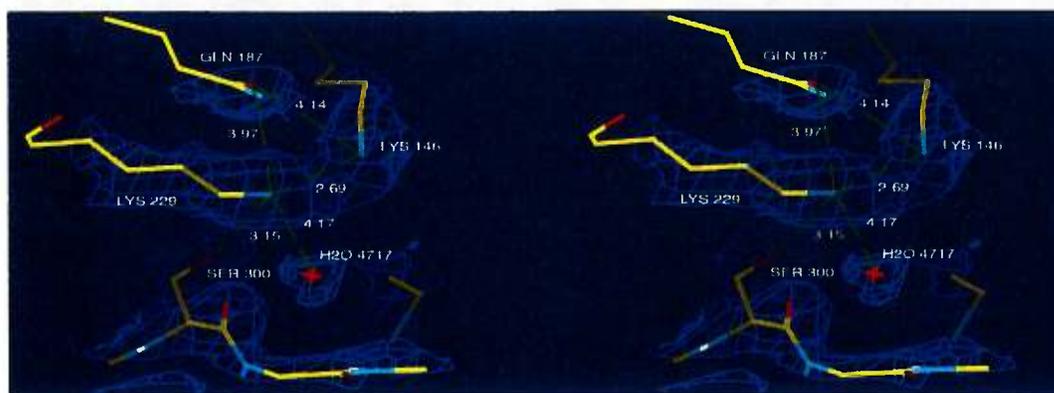
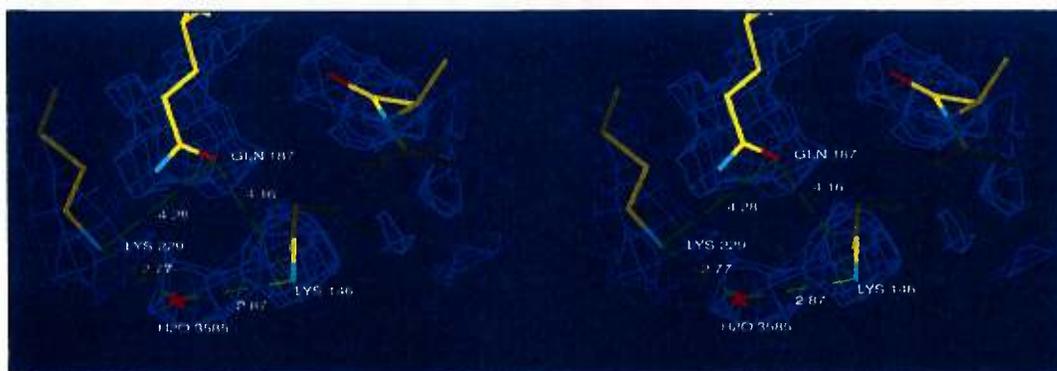
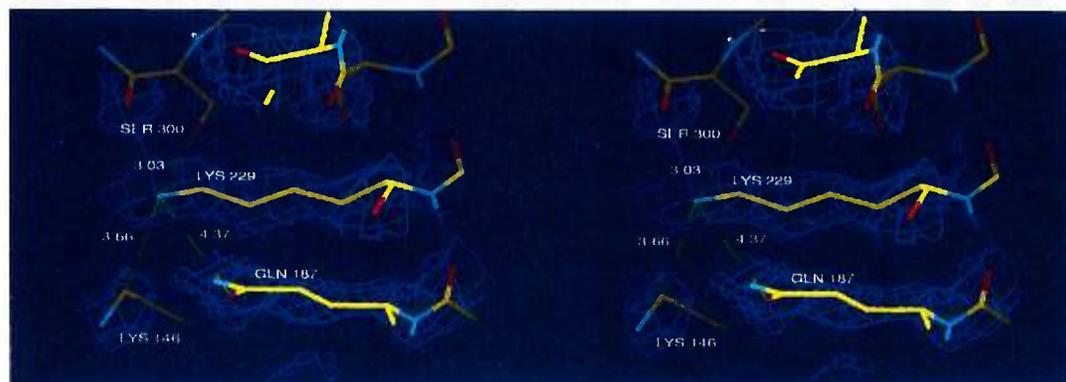
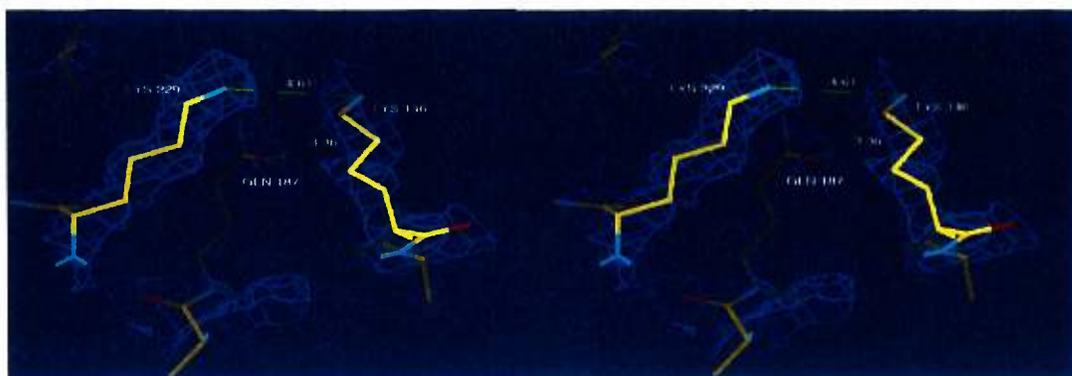


Figure 7 : Stereo view of side chain conformations for residues Lys-229 and Lys-146 observed in subunit 1, 2 , 3 and 4 of the mutant E187Q of rabbit muscle aldolase. Hydrogen bonds between both Lys-146 Nz and Lys-229 Nz in the subunit 4. Absence of DHAP in actives sites. Electron-density envelope was contoured at 0.6σ .

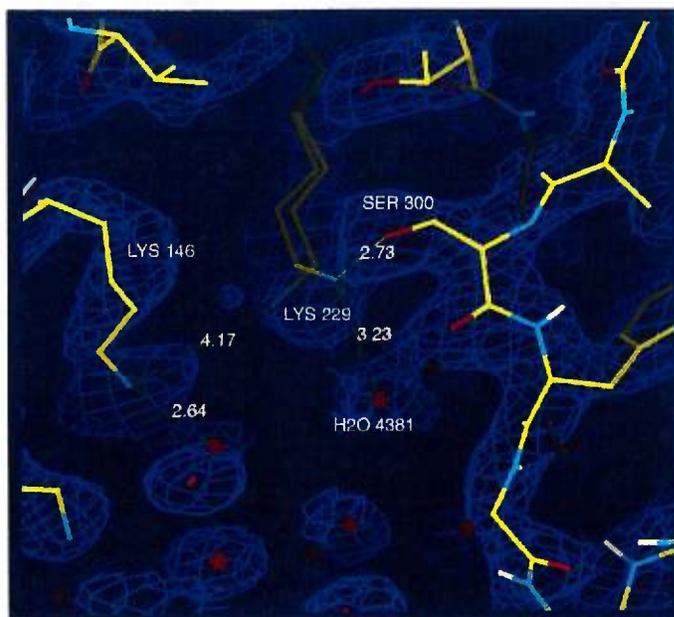
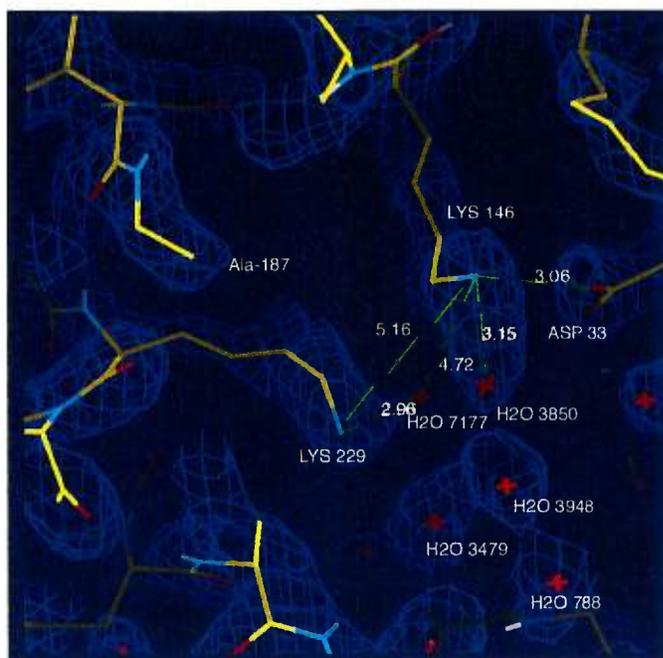


Figure 8 : Stereo view of side chain conformations for residues Lys-229 and Lys-146 observed in subunit 3 and 4 of the mutant E187A of rabbit muscle aldolase. Electron-density envelope was contoured at 0.6σ .

^{1,26,28,32,45,48,50,51} Blom N., Sygusch J., (1997) Product binding and role of the C-terminal region in Class I D-fructose 1,6 bisphosphate aldolase. *Nature Struct. Biol.* **4**(1), 36-39.

^{2,34} Sygusch J. Beaudry D., Allaire M., Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7 Å resolution., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 7846-7850 (1987).

³ Blom N., Sygusch J., Product binding and role of the C-terminal region in Class I D-fructose 1,6 bisphosphate aldolase. *Nature Struct. Biol.* **4**(1), 36-39 (1997).

⁴ Gamblin S.J., Davies G.J., Grimes J.M., Jackson R.M., Littlechild J.A., Watson H.C., (1991) Activity and specificity of human aldolases., *J. molec. Biol.* **219**, 573-576.

⁵ Hester G., Brenner-Holzach O., Rossi F.A., Struck-Donatz M., Winterhalter K.H., Smith J.D.G., Piontek K., The crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Drosophila melanogaster* at 2.5 Å resolution., *FEBS Letters* **292**, 237-242 (1991).

^{6,27} Kim H., Hol W.G.J., (1998) Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*., *J Mol Biol.* **278**, 5-11.

⁷ Midelfort C.F., Gupta R.K., Rose I. A., (1976) Fructose-1,6-bisphosphate : isomeric composition kinetics and substrate specificity for the aldolases. *Biochem* **15**, 2178-2185.

⁸ Rose I. A., O'Connell E.L., (1977) Specificity of fructose-1,6-P₂ aldolase(muscle) and partition of the enzyme among catalytic intermediates in the steady state. *J Biol Chem.* **252**, 479-482.

⁹ Shapiro S., Enser M., Pugh E., Horecker B.L., (1968) The effect of pyridoxal phosphate on rabbit muscle aldolase, *Arch. biochem. Biophys.* **128**, 554-562 .

¹⁰ Anai M., Lai C.Y., Horecker B.L., (1973) The pyridoxal phosphate-binding site of rabbit muscle aldolase., *Arch. biochem. Biophys.* **156**, 712-719.

¹¹ Patthy L., V'aradi A., Th'esz J., Kov'acs K.,(1979) Identification of the C-1-phosphate-binding arginine residue of rabbit muscle aldolase. Isolation of 1,2-cyclohesanedione-labeled peptide by chemisorption chromatography. *Eur J Biochem.* **99**,309-313.

¹² Lobb R.R., Stokes A. M., Hill H. A., Riordan J. F., (1976) A functional arginine residue in rabbit muscle aldolase. *Eur J Biochem.* **70**, 517-522.

¹³ Grazi , E., Rowley, P. T., Cheng, T. Tchola, O. and Horecker, B. L. (1962) The mechanism of action of aldolases : III-Shiff base formation with lysine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 38-43.

^{14,22} Ray B.D., Harper E.T., Fife W.K., (1983) ¹³C NMR evidence of carbinolamine formation at the active site of an imine-forming aldolase. *J Am Chem Soc* **105**, 3731-3732.

^{15,23,46} Rose I.A., Warms J.V., (1985) Complexes of muscle aldolase in equilibrium with fructose-1,6-biphosphate. *Biochem* **24**, 3952-3957.

¹⁶ Avigad, G. and England, S. (1972) The covalent binding of D-fructose-1,6-diphosphate to muscle aldolase. *Archiv. Biochem. Biophys.* **158**,337-346.

^{17,43,49} Blonski C., Demoissac D., Périé J., Sygusch J., (1997) Inhibition of rabbit muscle aldolase by phosphorylated aromatic compounds. *Biochem J.*, **323**, 71 -77 .

¹⁴ Morris, A. J. and Tolan, D. R. (1993) Site directed mutagenesis identifies aspartate 33 as a previously unidentified critical residue in the catalytic mechanism of rabbit aldolase A. *J. Biol. Chem.* **268**, 1095-1100.

¹⁹ Rose I.A., O'Connell E.L., Mehler A.H., Mechanism of the aldolase reaction, *J. biol. Chem.* **240**, 1758-1765 (1965).

²⁰ Healy M.J., Christen P., Mechanistic probes for enzymatic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase,

aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphoglyconate dehydrogenase), *Biochemistry* **12**, 35-41 (1973).

²¹ Kuo D.J., Rose I.A., (1985) Chemical trapping of complexes of dihydroxyacetone phosphate with muscle fructose-1,6-biphosphate aldolase. *Biochem* **24**, 3947-3952.

^{24,30} Morris A.J., Tolan D.R., (1993) Site-directed mutagenesis identifies aspartate 33 as a previously unidentified critical residue in the catalytic mechanism of rabbit aldolase A., *J Biol. Chem.* **268** (2), 1095-100

²⁵ Morris A.J., Davenport C. R., Tolan D.R., (1996) A lysine to arginine substitution at position 146 of rabbit aldolase A changes the rate-determining step to Schiff base formation, *Protein Engineering.* **9** (1), 61-67.

³² Berthiaume L., Tolan D.R., Sygusch J., Differential usage of the carboxyl-terminal region among aldolase isozymes., *J. Biol. Chem.* **268**, 10826-10835 (1993).

³³ communication MDA, 1994

³⁵ XGEN *User Guide*, Version 1.0, (Burlington (MA): Molecular Simulations, 1990).

^{36,37} Brünger A.T., X-PLOR *Manual*, Version 3.1, (New Haven:Yale University Press, 1992).

³⁸ Jones T.A., Zou J.Y., Cowan S.W., Kjeldgaard M., (1991) Improved methods for the building of protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta crystallogr.* **47**, 110-119.

³⁹ Kleywegt G.J., Jones T.A., Good model-building and refinement practice, *Meth. Enzymology* (eds. Sweet R.M., Carter C.W., 1997), in press.

⁴⁰ Blom N.S., Sygusch J., Enhanced electron density envelopes by extended solvent definition., *Acta Cryst D*, in press (1997).

⁴¹Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M., (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. appl. Cryst.* **26**, 283-291.

⁴²Lobb R.R., Stokes A. M., Hill H. A., Riordan J. F., (1976) A functional arginine residue in rabbit muscle aldolase. *Eur J Biochem.* **70**, 517-522.

⁴⁴Hartman F. C. and Brown, J. P. (1976) Affinity labeling of a previously undetected essential lysyl residue in Class I fructose biphosphate Aldolase. *J. Biol. Chem.* **251**,(10) 3057 –3062.

⁴⁶ Rose I. A., Warms J.V., Kuo D.J., (1987) Concentration and partitioning of intermediates in the fructose biphosphate aldolase reaction. *J Biol Chem* **262**, 692-701.

⁵²Littlechild J.A., Watson H.C., (1993) A data-based reaction mechanism for type I fructose bisphosphate aldolase. *Trends Biochem Sci* **18**,36-39.

Annexe 2

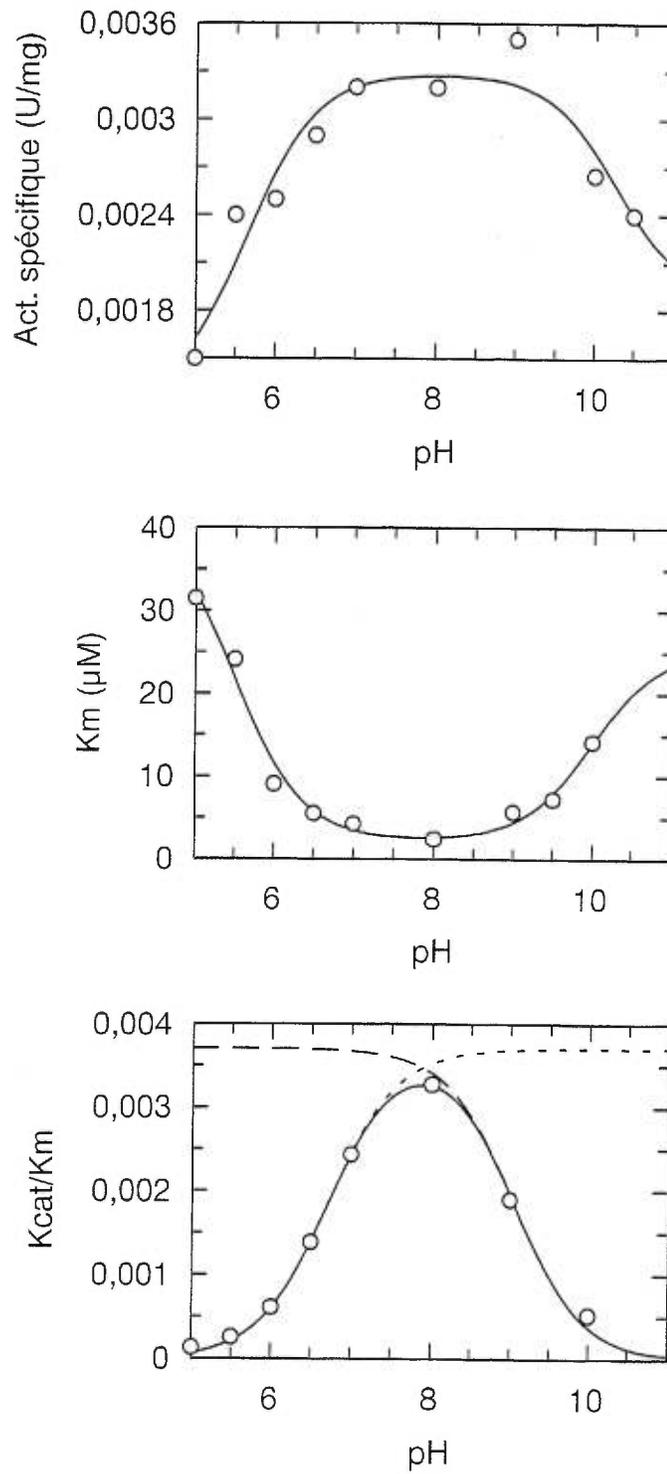


Figure 1. Profils de pH du mutant D33N de l'aldolase du muscle de lapin (Demoissac., 1995)

Annexe 3

	SU1	SU2	SU3	SU4
Lys-229	3.35 Å O H DHAP(A) 3.4 Å O ₂ DHAP(A) 2.9 Å Ser-300	2.89 Å 2549 H ₂ O(38) 2.79 Å 2461 H ₂ O(38) 2.82 Å Ser-300	3.03 Å 3921H ₂ O (33) 3.44 Å 749H ₂ O (91.7) 3.06 Å Ser-300	2.94 Å Ser-300 2.83 Å 4424H ₂ O (62)
Lys-146	3.05 Å 1525 H ₂ O(16) 2.84 Å O ₂ DHAP(A) 2.82 Å O ₃ DHAP(A) 3.15 Å C ₃ DHAP(A)	2.69 Å Asp-33 3.2 Å 2940 H ₂ O(58.5) 3.1 Å 2862 H ₂ O(22)	2.92 Å 3921H ₂ O (32) 2.97 Å 3887H ₂ O (33) 2.98 Å Asp-33 3.28 388H ₂ O(36)	3.16 Å 4718 H ₂ O (19) 2.79 Å 4732 H ₂ O (35) 3 Å 4769H ₂ O(25) 2.8 Å Asp-33
Lys-107	3.14 Å Asp-33 3.23 Å 1856 H ₂ O(36)	2.89 Å Asp-33	2.8 Å Asp-33	2.74 Å Asp-33
Glu-187	3.13 Å 1610 H ₂ O(34) 3.06 Å C ₃ DHAP (A)	2.69 Å 2868 H ₂ O(31) 3.2 2862 H ₂ O(22)	2.8 Å 3888 H ₂ O(36) 3.26 3847 H ₂ O(18)	2.68 Å 4735 H ₂ O (29) 3.07 4718H ₂ O(19)
Asp-33	2.75 Å O ₂ DHAP(A)	2.95 Å Lys-146 3.27 Å 2549 H ₂ O(38.6) 2.89 Å Lys-107	2.98 Å Lys-146 3.16 Å 3921 H ₂ O(33.6)	2.8 Å Lys-146 2.74 Å Lys-107 2.88 Å 4769 H ₂ O(25)
Glu-189	3.13 Å 1610H ₂ O(34) 2.96 Å 1496 H ₂ O(14.8) 3.1 Å Arg-148	2.88 Å 2509 H ₂ O(25) 3.06 Å 2903H ₂ O(32.8) 2.87 Å 2804 H ₂ O(18) 2.77 Å Arg-148	2.75 Å Arg-148 2.85 Å 3920 H ₂ O(37) 2.97 H ₂ O(16) 2.98 Å 2941 H ₂ O(57) 2.99 Å 3717 H ₂ O(67)	3 Å 4740 H ₂ O(33) 2.9 Å 4642 H ₂ O(14) 2.71 Å Arg-148
Arg-148	2.71 Å Glu-189 3.14 Å 1615 H ₂ O(45) 3.2 1818 H ₂ O (18) 3.15 Å 1645 H ₂ O (45)	2.77 Å Glu-189 2.88 2509H ₂ O(16) 3.25 2941 H ₂ O(51)	2.89 Arg-148 2.90 Å 731 H ₂ O (34) 3.24 Å 3920 H ₂ O(37)	2.71 Å Glu-189 3.15 Å 8156 H ₂ O(50) 3.17 Å 4922 H ₂ O(35) 3.19 Å 4923 H ₂ O(57)
Asp-109	2.81 Å 1525 H ₂ O (16.7) 3.02 Å 1646 H ₂ O (20.5)	2.77 Å Glu-189 3.4 Å 2569 H ₂ O(40)	2.98 Å 3809H ₂ O(15) 2.79 Å 3717H ₂ O(67)	2.74 Å 4718 H ₂ O(19) 3 Å 4499 H ₂ O(35.3)

Tableau : Interactions des acides minés du site actif de l'aldolase du muscle de lapin avec les proches voisins et les molécules d'eau dont le facteur d'agitation thermique est indiqué entre parenthèses.

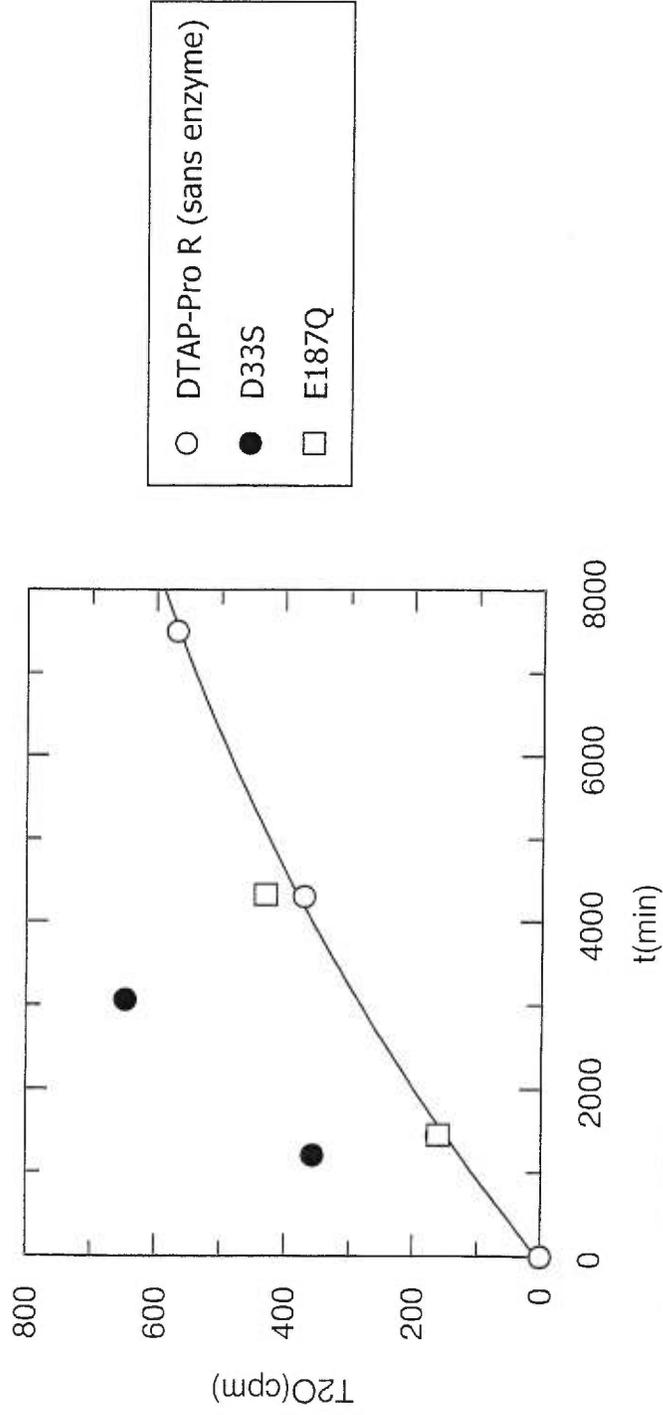


Figure 2 : Echange isotopique du tritium en pro-R du carbone C3 du DHAP catalysé par le mutant E187Q et D33S et comparé à l'échange effectué sans enzyme

annexe 5

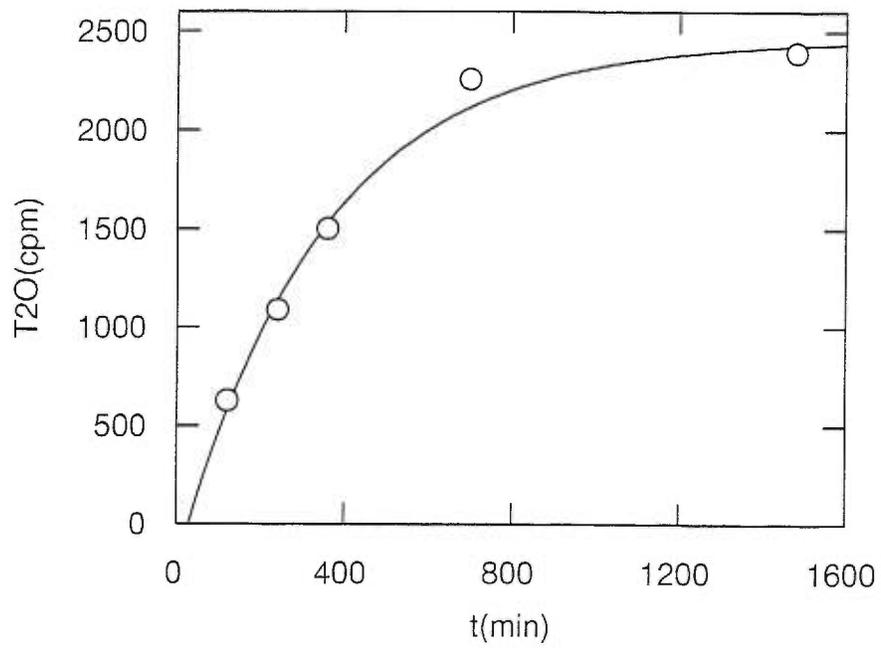


Figure 4 : Echange isotopique du tritium en position pro-R du carbone C3 du DHAP catalysé par le mutant K146M de l'aldolase du muscle.