

Université de Montréal

**Extraction, purification et caractérisation
d'isoformes d'hexokinase
du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*)**

par

Marie-Claude Moisan

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Sciences Biologiques

Décembre, 2009

© Marie-Claude Moisan, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Extraction, purification et caractérisation
d'isoformes d'hexokinase
du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*)

Présentée par :
Marie-Claude Moisan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel P Matton, président-rapporteur

Jean Rivoal, directeur de recherche

Frédéric Marsolais, membre du jury

Résumé

L'hexokinase (HK) est la première enzyme du métabolisme des hexoses et catalyse la réaction qui permet aux hexoses d'entrer dans le pool des hexoses phosphates et donc par le fait même la glycolyse. Bien que le glucose soit son principal substrat, cette enzyme peut aussi phosphoryler le mannose et le fructose. Malgré son importance dans le métabolisme primaire, l'HK n'a jamais été purifiée à homogénéité sous forme native. Le but de ce travail était donc de purifier une isoforme d'HK à partir de tubercule de *Solanum tuberosum* et par la suite de caractériser ses propriétés cinétiques.

Bien avant que je commence mon travail, un groupe de recherche avait déjà séparé et partiellement purifié trois isoformes d'HK de *S. tuberosum*. Un protocole d'extraction était donc disponible, mais l'HK ainsi extraite était peu stable d'où le besoin d'y apporter certaines modifications. En y ajoutant certains inhibiteurs de protéases ainsi qu'en modifiant les concentrations de certains éléments, le tampon d'extraction ainsi modifié a permis d'obtenir un extrait dont l'activité HK était stable pendant au moins 72h après l'extraction, en empêchant la dégradation.

À l'aide du tampon d'extraction optimisé et d'une chromatographie sur colonne de butyl sépharose, il a été possible de séparer 4 isoformes d'HKs. Par la suite, une isoforme d'HK (HK1) a été purifiée à l'homogénéité à l'aide de 5 étapes de chromatographie supplémentaires. En plus de caractériser les propriétés cinétiques de cette enzyme, l'analyse de séquençage par MS/MS a permis de l'associer au produit du gène *StHK1* de *Solanum tuberosum*. Avec une activité spécifique de 10.2 U/mg de protéine, il s'agit de l'HK purifiée avec l'activité spécifique la plus élevée jamais rapportée d'un tissu végétal.

L'ensemble des informations recueillies lors de la purification de HK1 a ensuite été utilisée pour commencer la purification d'une deuxième isoforme (HK3). Ce travail a permis de donner des lignes directrices pour la purification de cette isoforme et certains résultats préliminaires sur sa caractérisation enzymatique.

Mots-clés : Hexokinase, tubercule de pomme de terre, purification de protéine, caractérisation enzymatique.

Abstract

Hexokinase (HK) catalyzes the first step of hexose metabolism by phosphorylating hexose to generate the corresponding hexose phosphate thereby allowing hexose entrance in glycolysis. Even though glucose is the main substrate, HK can also phosphorylate a broad spectrum of hexoses. Despite its importance this enzyme has never been purified to homogeneity in a native form. The aim of this work was therefore to purify this enzyme from *Solanum tuberosum* tubers and subsequently characterize its kinetic properties.

Before I started this work, another group had already separated and partially purified 3 HK isoform from *S. tuberosum*. An extraction protocol was available but improvement was necessary since the extracted HK had little stability. By adding some protease inhibitors and by modifying the concentration of certain components in the extraction buffer we were able to obtain an extract with a HK activity stable for at least 72 h after extraction by preventing degradation.

With this buffer and chromatography on butyl sepharose it was possible to separate 4 HK isoforms from *S. tuberosum*. After 5 more chromatographic steps, one HK isoform was purified to homogeneity (HK1). This enzyme was characterized and sequenced by MS/MS. We were able to associate this protein sequence with the gene product of *StHK1* from *S. tuberosum*. With a specific activity of 10.2 U/mg of protein, this is the HK with the highest specific activity ever reported from a plant tissue.

All the information gathered while purifying HK1 was used to undertake the purification of a second isoform (HK3). We were able to obtain preliminary results on its kinetic properties.

Keywords: Hexokinase, potato tuber, protein purification, protein characterization.

Table des matières	
Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Abbréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction.....	17
1.1 Définition et caractéristiques de l’HK.....	20
1.1.1 Spécificité.....	20
1.1.2 Taille.....	21
1.1.3 Phylogénie.....	22
1.2 Données physiologiques, et biochimiques sur les HKs végétales.....	23
1.2.1 La purification partielle et la caractérisation biochimique de l’HK de pomme de terre.....	23
1.2.2 Propriétés cinétiques des HKs.....	24
1.2.3 Les HKs de la pomme de terre sont exprimées de façon différentielle en fonction du tissu et du développement.....	24
1.2.4 Contrôle de l’activité HK par le métabolisme.....	25
1.3 Caractérisation des HKs 1 et 2 de tubercules de pomme de terre par transgénése.....	27
1.3.1 HK1.....	28
1.3.2 HK2.....	28
1.3.3 Interprétation des expériences de transgénése.....	29
1.4. Les isoformes d’HKs ont différentes localisations subcellulaires.....	30
1.4.1 L’activité HK est associée à différents compartiments cellulaires.....	30
1.4.2 L’approche bioinformatique d’Olsson et al. (2003).....	31
1.4.3 Évolution et rôles proposés des HKs de type A et B.....	35
1.5 Le rôle de l’HK dans la signalisation du Glc.....	43

1.5.1 L'activité de signalisation du Glc est associée à l'isoforme mitochondriale	43
1.6 Certaines isoformes HK n'ont pas d'activité catalytique.....	47
Préambule.....	49
Chapitre 2 : Mise au point d'un milieu d'extraction permettant de protéger l'hexokinase de tubercule de pomme de terre contre la dégradation	50
2.1 Introduction	50
2.2 Matériels et méthodes	52
2.2.1 Produits chimiques et matériel végétal	52
2.2.2 Mesure de l'activité enzymatique et dosage des protéines	52
2.2.3 Tampons utilisés pour la chromatographie sur colonne Butyl Sepharose 4 Fast Flow	53
2.2.4 Extraction de l'HK des tubercules de <i>S. tuberosum</i> et chromatographie sur colonne de Butyl Sépharose.....	53
2.3 Résultats et discussion	55
2.3.1 Stabilité de l'activité enzymatique dans le temps après extraction.....	55
2.3.2 Analyse par immunodétection	59
2.3.3 Profils chromatographiques sur colonne d'interactions hydrophobes	61
2.4 Conclusion	63
Chapter 3: Purification, identification and characterization of Hexokinase 1 from potato (<i>Solanum tuberosum</i>) tubers	64
3.1 Abstract	64
3.2 Introduction.....	64
3.3 Experimental	66
3.3.1 Chemicals and Plant material.....	66
3.3.2 Enzyme activity and protein assays	67
3.3.3 Buffers used in HK1 purification.....	68
3.3.4 Purification of HK1 from potato tuber.....	68
3.3.5 SDS-PAGE and immunoblot analysis	70

3.3.6 Silver nitrate staining in preparation for mass spectrometry analysis.....	70
3.3.7 Mass spectrometry analysis.....	71
3.3.8 Kinetic analysis	72
3.4 Results and discussion	73
3.4.1 Separation of 4 HK activity peaks and purification of HK1	73
3.4.2 Electrophoresis and immunoblot analysis.....	78
3.4.3 Gene product identification.....	80
3.4.4 Kinetic analysis of the HK1 isoform.....	83
3.4.5 Mitochondrial hexokinase and ROS production	89
3.5 Conclusion	90
3.6 Acknowledgements	90
Chapitre 4: Purification partielle et caractérisation d'une hexokinase de tubercule de pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	91
4.1 Introduction.....	91
4.2 Matériels et méthodes	92
4.2.1 Produits chimiques et matériel végétal	92
4.2.2 Mesure de l'activité enzymatique et dosage des protéines	92
4.2.3 Tampons utilisés pour la purification HK3	93
4.2.4 Purification de l'HK3 des tubercules de pomme de terre	93
4.2.5 SDS-PAGE et analyse par immunodétection.....	96
4.2.6 Coloration au nitrate d'argent et préparation pour l'analyse par spectrométrie de masse.....	97
4.2.7 Analyse par spectrométrie de masse	97
4.2.8 Analyse des propriétés cinétiques	98
4.3 Résultats et discussion	98
4.3.1 Séparation de 4 pics d'activité HK et purification partielle de l'HK3	98
4.3.2 Analyse par électrophorèse et immunodétection	102
4.3.3 Séquençage par MS du polypeptide HK3 purifié	105

4.3.4 Données préliminaires de cinétique de saturation de HK3 par le glucose.....	105
4.4 Conclusion	107
Conclusion	108
Bibliographie.....	I

Liste des tableaux

Chapitre 3: Purification, identification and characterization of Hexokinase 1 from potato (*Solanum tuberosum*) tubers

Table 1	Purification of HK1 from potato tuber.....	77
Table 2	Subcellular localisation prediction for potato HK1.....	82
Table 3	Kinetic parameters of HK1 purified from potato tuber.....	86

Chapitre 4: Purification partielle et caractérisation d'une hexokinase de tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*)

Tableau 1	Séquences générées par la MS identiques aux produits de deux gènes de <i>S. tuberosum</i>	106
Tableau 2	Constantes catalytiques avec le glucose de HK3 de tubercules de pomme de terre	107

Liste des figures

Chapitre 2 : Mise au point d'un milieu d'extraction permettant de protéger l'hexokinase de tubercule de pomme de terre contre la dégradation

Figure 1 :

Analyse de la stabilité de l'activité HK dans le temps suite à l'utilisation du tampon d'extraction amélioré ou du tampon d'extraction de Renz et al. (1993).....56

Figure 2

Analyse par immunodétection de la stabilité de l'HK et en fonction du temps suite à l'utilisation du tampon d'extraction amélioré ou du tampon d'extraction de Renz et al. (1993).60

Figure 3

Profils chromatographiques suite à l'utilisation du tampon d'extraction amélioré ou du tampon d'extraction de Renz et al. (1993).....62

Chapitre 3: Purification, identification and characterization of Hexokinase 1 from potato (*Solanum tuberosum*) tubers

Figure 1

Chromatographic profiles of the different steps of HK1 purification from potato tuber...75

Figure 2

SDS/PAGE and immunoblot analysis of the purification of HK1 from potato tuber.....79

Figure 3	
Amino acid sequence alignment of the tryptic fragments obtained after mass spectrometry analysis HK1_SOLTU (064390).....	81

Figure 4	
Effect of pH on the activity of HK1 from potato tuber.....	84

Figure 5	
Inhibition by ADP of HK1 from potato tuber.....	87

Chapitre 4: Purification partielle et caractérisation d'une Hexokinase de tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*)

Figure 1	
Profil chromatographique des différentes étapes de la purification partielle de HK3 à partir de tubercule de pommes de terre.....	100

Figure 2	
Analyse par SDS-PAGE et immunodétection de la purification partielle de l'HK3 à partir de tubercule de pomme de terre.....	104

Abréviations

ϵ ACA : ϵ -amino-n-caproïd-acid

aa: acide aminé

DTT: dithioltheitol

EGTA: acide éthylène glycol tétra acétique

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

F6P : fructose-6-phosphate

FK: Fructokinase (EC 2.7.1.4)

Fru: fructose

G1P: glucose-1-phosphate

G6P: glucose-6-phosphate

GK: glucokinase (EC 2.7.1.2)

Glc: glucose

Hepes: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

kDa: kilodalton

μ M : micromolaire

mM : millimolaire

Man: mannose

(NH₄)₂SO₄: sulfate d'ammonium

NLS: signal de localisation au noyau

PMSF: fluorure de phénylméthylsulphonyle

PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone

HK: Hexokinase (EC 2.7.1.1)

HAP: ceramic hydroxyapatite Econo-Pac CHT-II Cartridge

MS: Mass spectrometry

OPPP: voie oxydative des pentoses phosphates

PHB: polyhydroxybutyrate

ROS: reactive oxygen species

UDP-Glc: UDP-glucose

VDAC: canaux anioniques voltage-dépendant

Remerciements

Un gros merci à :

Mon Philou pour ta grande patience, tes encouragements, ta présence, tes connaissances en bio mol, ta cuisine et ta brouette.

Ma famille. Didi, Bear, Duck (Smurf), Ti-Gui, Marie, Franky, Yo, Gaby, René et tous les autres pour votre amour inconditionnel. Merci Dali, Chapy, Charlotte et le poulet au beurre du Taj.

Mes amis. MCrisse, Mimi, Stevie et Jo l'ananas pour le chalet et le rockebandage. Malheureusement, nous n'aurons jamais eu le temps de filmer attaque à la tronçonneuse dans les chambres de croissances de l'IRBV. Guig, Berg, Marie-Lo, Doudou, Henry, Caro, Fred, Pépé et Sophie pour être tout simplement là. Maya pour être une super amie et d'être capable de vivre avec moi. Edith pour avoir passé avec moi les moments parfois amusants et parfois plus difficiles de la maîtrise. Evgenia, Julie, Mariannick, Carole, Éric, Érin, Josée, Faiza, Rabah et toutes les autres merveilleuses personnes que j'ai rencontrées lors de mes années passées au jardin avec qui j'ai beaucoup appris. J'ai particulièrement adoré mes diners avec vous tous. Merci à Éric pour nos conversations sur l'HXX, à Jo pour m'avoir fait connaître le monde merveilleux des écureuils du Jardin et avoir caché mes clés au moins une fois par semaine. Merci Adrian (Troncoso-Ponce) pour l'été 2006 (ou 2007) au labo.

Et finalement, un dernier merci aux derniers et non les moindres, Jean et Sonia pour m'avoir accueilli dans le labo. Et oui, j'ai bel et bien choisi mon projet de maîtrise après avoir vu le FPLC dans le déli! Merci Sonia pour tes explications et ton aide pour les vérifications de calculs. Sans vous, je n'aurais jamais eu la chance de passé ces dernières années au Jardin.

Chapitre 1 : Introduction

La pomme de terre a une grande importance agroalimentaire. Avec une production annuelle dépassant les 325 millions de tonnes, il s'agit de la quatrième plus importante culture au monde (FAO, 2007). De nombreux travaux ont donc été entrepris dans le but d'en améliorer la production. L'amidon étant un constituant de sa chair, on mise actuellement sur la voie de transition du saccharose en amidon et sur les modifications génétiques de la voie de la glycolyse pour obtenir des pommes de terre avec un taux d'amidon plus élevé (Fernie, A. R. et al. 2002, Fernie, A. R. and Willmitzer, L. 2001), l'amidon. Pour le moment, les travaux ne donnent pas nécessairement les résultats escomptés. Par exemple, certains ont proposé d'essayer d'augmenter la vitesse de dégradation du saccharose dans le tubercule pour faire pencher le métabolisme vers la biosynthèse et l'accumulation d'amidon (Sonnewald, U. et al. 1997, Trethewey, R. N. et al. 1999). Cependant, ces tentatives ont plutôt entraîné une diminution du taux d'accumulation d'amidon, l'induction de la glycolyse et un déplacement du carbone vers la respiration (Fernie, A. R. et al. 2002). Certaines modifications dans l'expression d'enzymes ont entraîné l'augmentation du taux d'amidon sans nécessairement augmenter le rendement (Nunes-Nesi, A. et al. 2005). Par contre, on peut noter le succès mitigé obtenu avec la surexpression de l'ADP-glucose-pyrophosphorylase dans les tubercules de pomme de terre (Stark, D. M. et al. 1992, Sweetlove, L. J. et al. 1996).

On peut penser qu'éventuellement, la production de tubercules de pommes de terre aura une importance qui ira au delà de l'alimentation. Par exemple, des modifications génétiques ont permis de produire des tubercules de pommes de terre qui synthétisent du polyhydroxybutyrate (PHB) (Bohmert, K. et al. 2002). Le PHB est produit naturellement dans certaines bactéries et peut être transformé en plastique biodégradable. Leur production dans les bactéries étant très coûteuse, leur utilisation est grandement restreinte (Godbole, S. et al. 2003). Le tubercule, de par ses propriétés d'accumulation, pourrait permettre la production de ces molécules en grandes quantités à moindre coût. Mais il reste à

augmenter la quantité de cette composante par gramme de pomme de terre pour rendre cette méthode plus efficace. Tout comme avec l'amidon, la façon d'y arriver consiste à modifier les voies métaboliques primaires.

Il est généralement reconnu que ce qui s'applique habituellement à *A.thaliana* s'applique aux autres plantes. Dans le cas des tubercules de pomme de terre il en est tout autrement, puisqu'*A. thaliana* ne possède pas ce genre d'organe d'accumulation (Ferne, A. R. and Willmitzer, L. 2001). Il est logique de penser que dans le futur, on pourra générer de façon rationnelle des variétés de pomme de terre ayant un métabolisme primaire altéré ayant une capacité plus élevée d'accumulation d'amidon ou de composés comme le PHB. Pour atteindre ces buts, il sera nécessaire de bien comprendre le fonctionnement et la régulation des voies métaboliques en jeu. Les études des capacités de biosynthèse et de stockage du tubercule doivent donc se faire directement avec la pomme de terre.

Chez les végétaux, la voie de la glycolyse joue un rôle de pourvoyeur de carbone pour de nombreuses voies de biosynthèse. Elle alimente la respiration cellulaire dans les mitochondries et sert également à fournir l'énergie à la cellule sous forme d'ATP (Plaxton, W. C. 1996). Bien que la glycolyse soit relativement bien connue, les résultats obtenus après des tentatives de modification de certaines voies de biosynthèses sont parfois contraires aux attentes (Thomas, S. et al. 1997a). Plusieurs aspects du métabolisme des sucres sont encore très peu compris et les interactions complexes qui interviennent dans sa régulation ne sont pas complètement élucidés (Ferne, A. R. et al. 2002). Les enzymes d'une voie doivent être considérées comme un tout et non de façon indépendante pour pouvoir éventuellement obtenir les résultats escomptés (Thomas, S. et al. 1997b).

Pour le moment, il est donc important de comprendre les mécanismes de régulations des voies métaboliques pour utiliser cette information comme référence dans des modifications génétiques. Une meilleure compréhension de la voie glycolytique pourrait permettre d'augmenter de façon rationnelle la production de certaines cultures et éventuellement de créer des tubercules qui pourraient accumuler certains composés spécifiques.

La respiration dans la mitochondrie est le principal pourvoyeur d'ATP dans les cellules végétales non-photosynthétiques. C'est la glycolyse qui lui fournit directement ou indirectement des substrats carbonés comme le pyruvate, l'oxaloacétate ou le malate. La consommation de ces substrats par le cycle de Krebs en condition aérobie permet à la mitochondrie de former du pouvoir réducteur et de l'ATP. De plus, la glycolyse fournit plusieurs précurseurs pour différents composés cellulaires. Par exemple, elle alimente la voie oxydative des pentoses phosphate qui à son tour va fournir certaines voies de biosynthèse pour les nucléotides et les acides nucléiques. Chez les plantes, la glycolyse est compartimentée : deux voies glycolytiques fonctionnent en parallèle dans le cytosol et les plastes. Ceci permet d'isoler certaines voies métaboliques qui sont branchées sur la glycolyse. Par exemple, la synthèse et la dégradation de l'amidon ou la synthèse des lipides a lieu dans les plastes tandis que le catabolisme du saccharose a lieu dans le cytosol. De plus certaines enzymes assurent des réactions parallèles ou alternatives, ce qui donne à la glycolyse végétale une structure réticulaire qui peut être modulée en fonction des stress environnementaux ou des conditions physiologiques de la plante (Plaxton, W. C. 1996). La glycolyse a donc un rôle central dans l'utilisation du carbone et l'hexokinase (HK), suite à la dégradation du saccharose ou de l'amidon, permet l'entrée du glucose dans le pool des hexoses phosphate, d'où l'importance de cette enzyme.

La caractérisation biochimique des enzymes intervenant dans une voie métabolique permet de mieux comprendre le fonctionnement et la régulation de cette voie. Il est donc important de considérer la purification et la caractérisation individuelle des enzymes glycolytiques comme une partie intégrante d'une stratégie visant à mieux connaître le fonctionnement de la glycolyse. L'HK, bien qu'elle soit la première enzyme de la glycolyse n'a encore jamais été purifiée à homogénéité à partir de tissus végétaux et donc ses propriétés cinétiques ne sont pas complètement connues.

1.1 Définition et caractéristiques de l'HK

Les HKs catalysent la phosphorylation de différents hexoses en utilisant une molécule d'ATP. Cette enzyme catalyse la première étape irréversible de la chaîne de réactions qui permet l'utilisation des hexoses par la cellule. Cette réaction produit une molécule d'hexose-6-phosphate et une molécule d'ADP et constitue une étape régulatrice. Comme il sera vu plus tard, l'HK est également impliquée dans la signalisation du glucose (Jang, J. C. and Sheen, J. 1994). Il a été démontré que la fonction de signalisation de l'HK est indépendante de sa fonction catalytique (Moore, B. et al. 2003).

1.1.1 Spécificité

D'autres enzymes sont connus pour phosphoryler les hexoses, comme les glucokinases (GK) et les fructokinases (FK). Ces enzymes sont spécifiques à un type d'hexose (Pego, J. V. and Smeekens, S. C. 2000). L'HK, quant à elle, a la capacité de phosphoryler différents types d'hexoses tel le glucose (Glc), le fructose (Fru) et le mannose (Man) (Claeyssen, E. and Rivoal, J. 2007). L'HK a donc un large spectre de substrats comparativement aux FKs

et GK (Cardenas, M. L. et al. 1998, Renz, A. and Stitt, M. 1993). Son affinité pour le Glc est habituellement plus élevée, bien qu'il existe quelques cas, où l'affinité d'une isoforme pour le Fru soit plus élevée (Martinez-Barajas, E. and Randall, D. D. 1998).

1.1.2 Taille

Les séquences d'ADNc des différentes isoformes d'HKs codent pour des protéines de 496 à 502 aa, ce qui correspond à des poids moléculaires variant entre 53 et 54 kDa (Claeyssen, E. et al. 2006, Dai, N. et al. 2002, Giese, J. O. et al. 2005, Jang, J. C. et al. 1997, Kandel-Kfir, M. et al. 2006, Kim, M. et al. 2006, Menu, T. et al. 2001, Veramendi, J. et al. 2002, Veramendi, J. et al. 1999, Wiese, A. et al. 1999). Des immunodétections démontrent que le poids moléculaire de l'HK dénaturée est d'environ 54 kDa (Giese, J. O. et al. 2005, Wiese, A. et al. 1999). Des poids moléculaires natifs entre 38 et 280 kDa ont aussi été rapportés suite à des chromatographies par filtration sur gel (Renz, A. et al. 1993, Rezende, G. L. et al. 2006, Yamamoto, Y. T. et al. 2000). Dans le cas des valeurs inférieures à 54 kDa, elles peuvent être dues au clivage d'un peptide signal (Giese, J. O. et al. 2005). Le fait que l'on retrouve des HKs avec un poids moléculaire natif dépassant celui d'une sous-unité suggère soit la formation d'oligomères d'HKs, soit la formation de complexes avec des partenaires d'interaction (Renz, A. et al. 1993, Yamamoto, Y. T. et al. 2000).

Les séquences d'ADNc des différentes isoformes de FKs codent quant à elles pour des protéines de 328 à 386 aa ce qui correspond à des poids moléculaires inférieurs à 40 kDa (German, M. A. et al. 2002, German, M. A. et al. 2004, Kanayama, Y. et al. 1997). Les HKs et les FKs ont donc des tailles qui les distinguent l'une de l'autre.

1.1.3 Phylogénie

Les GKs et les HKs de levures et de mammifères partagent des domaines similaires de liaison pour le sucre et le phosphate de l'ATP, et des analyses d'alignement de séquences entre les plantes, les levures et les mammifères laissent supposer que les GKs soient en fait des HKs (Dai, N. et al. 1999). Certaines enzymes ont été considérées comme des GKs chez les mammifères pour leur grande spécificité pour le Glc, mais en présence d'une forte concentration en Fru, ces mêmes enzymes ont une activité phosphorylante élevée ce qui est caractéristique des HKs (Cardenas, M. L. et al. 1998). Chez les animaux, les GKs auraient été incorrectement classées comme tel puisque qu'elles ont aussi la capacité de phosphoryler le fructose. Il est donc plus approprié de les classer comme des HKs (Cardenas, M. L. 1997). Les seules vraies GKs seraient celles trouvées chez les bactéries (Dai, N. et al. 2002).

Une seule GK végétale a cependant été rapportée par Martinez-Barajas et al. (1998). Mais comme cette enzyme peut aussi phosphoryler le Fru, et serait donc une HK plutôt qu'une FK (Dai, N. et al. 2002). La présence de GKs *sensu stricto* chez les plantes n'a donc jamais été réellement démontrée (Cardenas, M. L. et al. 1998, Dai, N. et al. 2002). Il est donc maintenant admis que l'on retrouve chez les végétaux des HKs et des FKs, mais pas de GKs. Le peu d'identité de séquence et aucun domaine conservé entre les FKs et les HKs suggère fortement qu'elles forment deux familles distinctes (Dai, N. et al. 2002).

Comme il sera vu plus tard, la phylogénie des HKs chez les végétaux a aussi permis de les séparer en deux groupes selon leur séquence en N-terminal et cette séquence permet de déterminer leur localisation intracellulaire (Olsson, T. et al. 2003).

1.2 Données physiologiques, et biochimiques sur les HKs végétales

Les HKs ont été mises en évidence pour la première fois chez les végétaux dans les années 1950 (Beevers, H. and Gibbs, M. 1954, Stumpf, P. K. 1953). Depuis, de nombreuses études ont tenté de mieux cerner la fonction de cette enzyme. Ces études ont d'abord commencé en utilisant des approches de biochimie classique, soit la purification et la caractérisation de ses propriétés cinétiques (Cardenas, M. L. et al. 1998, Renz, A. et al. 1993, Renz, A. and Stitt, M. 1993). Éventuellement plusieurs HKs partiellement purifiées ont été étudiées, mais aucune, jusqu'au présent travail, n'a encore été purifiée à homogénéité. Cette situation est peut-être explicable par le fait que les HKs sont généralement présentes en très faibles quantités et qu'il existe plusieurs isoformes HK dans les tissus végétaux.

1.2.1 La purification partielle et la caractérisation biochimique de l'HK de pomme de terre

Renz et al. (1993) a été le premier à séparer différentes isoformes d'HKs et de FKs à partir de tubercules de pomme de terre (Renz, A. et al. 1993). Cette purification partielle comprend 4 étapes de chromatographie, soit une première colonne chromatographique échangeuse d'anion, suivie d'une chromatographie sur une colonne Matrex Blue, d'une colonne Mono-Q et finalement d'une colonne de filtration sur gel. Ce travail a montré qu'il y avait au moins trois isoformes d'HKs dans les tubercules de pommes de terre, et la dernière étape de chromatographie sur colonne de filtration sur gel a permis de déterminer que le poids moléculaire des différentes isoformes était autour de 66 kDa.

1.2.2 Propriétés cinétiques des HKs

La caractérisation des propriétés cinétiques des 3 isoformes d'HKs partiellement purifiées par Renz et al. (1993) a permis de connaître les propriétés générales des différentes isoformes en déterminant les K_m , les V_{max} ainsi que les paramètres cinétiques d'inhibition. Les HKs ont une plus grande affinité pour le Glc comparativement au Fru. Le K_m du Glc est habituellement dans la gamme de concentration de l'ordre du micromolaire, comparativement au Fru qui est 1000 fois plus élevé (Dai, N. et al. 2002). Les valeurs de K_m pour le Man se trouvent habituellement dans les mêmes gammes que celui du Glc (Renz, A. and Stitt, M. 1993). Le manque de sélectivité des HKs et des FKs pour leurs substrats serait important pour permettre la mobilisation indépendante des deux principaux hexoses (le Fru et le Glc). Le niveau d'activité de ces enzymes pourrait aussi être contrôlé par leur différente compartimentation cellulaire ainsi que par celle des différents hexoses.

Bien que les HKs aient aussi la capacité d'utiliser d'autres nucléotides, l'ATP est clairement le substrat préféré des HKs, leur affinité étant nettement plus élevée qu'avec les autres nucléotides triphosphates (Cardenas, M. L. et al. 1998, Renz, A. and Stitt, M. 1993).

1.2.3 Les HKs de la pomme de terre sont exprimées de façon différentielle en fonction du tissu et du développement

Les profils d'élution chromatographique d'extraits de tubercules à différents moments de leur développement ainsi que d'extraits d'autres organes (feuilles) démontrent que le niveau d'expression des différentes isoformes varie selon les organes et le stade de développement (Renz, A. et al. 1993). L'activité HK est très faible dans les feuilles

comparativement à l'activité FK. Dans les jeunes tubercules l'activité FK est aussi plus élevée mais est peu à peu supplantée par celle de l'HK lors de l'entreposage et de la germination des tubercules. Les tubercules entreposés ont une activité enzymatique plus élevée pour l'isoforme HK2 mais cette activité diminue au détriment de l'HK1 lors de leur germination. L'expression différentielle des différentes isoformes suggère des rôles distincts pour chacune et des régulations différentes en fonction des tissus et de l'âge de la plante. Le changement de l'activité de phosphorylation des hexoses soit par les FKs ou les HKs reflète les besoins dans l'utilisation du Glc ou du Fru en fonction du développement. La régulation du métabolisme des hexoses varie selon que le tubercule soit en croissance, en entreposage ou en germination, puisqu'il passe d'un tissu qui accumule l'amidon (tissu puits) à un tissu qui le dégrade et l'exporte (tissu source) (Renz, A. et al. 1993).

1.2.4 Contrôle de l'activité HK par le métabolisme

À ce jour, les propriétés régulatrices des HKs végétales ont été établies sur des fractions partiellement purifiées. Il est donc impossible d'affirmer à quelles isoformes ces propriétés s'appliquent. De plus, les résultats obtenus par Renz, A. et al. (1993) peuvent être dus à un mélange d'isoformes non séparées par les techniques employées. Ces données constituent cependant un point de départ intéressant en vue de la caractérisation d'une isoforme isolée.

1.2.4.1 Contrôle de l'activité HK par ses substrats

Le K_m des HKs de pomme de terre pour le Glc se situe entre 0,035 et 0,13 mM (Renz, A. and Stitt, M. 1993) et les concentrations de Glc que l'on retrouve à l'intérieur des cellules des tissus hétérotrophes (tubercules) sont d'environ 16 mM dans les plastes et de plus de 33 mM dans le cytosol (Farré, E. M. et al. 2001). Ces données signifient que normalement, cette

enzyme n'est pas limitée par ce substrat. Il en est tout autrement pour l'ATP, les concentrations étant respectivement de 4,9 mM et 0,2 mM dans les plastes et le cytosol (Farré, E. M. et al. 2001), il est possible que les isoformes cytosoliques d'HK soient limitées par l'ATP puisque les K_m mesurés pour les isoformes de pomme de terre varient entre 0,09 et 0,56 mM (Renz, A. and Stitt, M. 1993).

1.2.4.2 Contrôle de l'activité HK par ses produits

Des mécanismes sont nécessaires pour contrôler une activité catalytique de l'HK trop élevée qui entraînerait une accumulation de composés phosphorylés ou bien un épuisement en ATP ou en phosphate inorganique. L'inhibition de la réaction enzymatique de l'HK par ses produits (G6P et ADP) pourrait moduler son activité enzymatique (Renz, A. and Stitt, M. 1993). L'HK est inhibé par l'ADP en compétition avec l'ATP. Des valeurs de K_i pour l'ADP établies sur des préparations partiellement purifiées sont comprises entre 0,04 et 0,0108 mM, ce qui est de 2 et 3 fois plus faible que les K_m de l'ATP. L'activité HK pourrait être efficacement modulée par le ratio ATP/ADP (Renz, A. and Stitt, M. 1993). Par exemple, en condition d'hypoxie, le déclin de la glycolyse observé dans la racine de maïs serait dû à l'inhibition de l'activité HK suite à la diminution du ratio ATP/ADP (Bouny, J. M. and Saglio, P. H. 1996).

Pour ce qui est de l'inhibition par le G6P, une seule isoforme de la pomme de terre est inhibée avec une valeur de K_i de 4 mM (Renz, A. and Stitt, M. 1993), ce qui est de beaucoup supérieur aux concentrations intracellulaires dans les plastes et le cytosol des tubercules qui sont respectivement entre 0,97 et 0,74 mM (Farré, E. M. et al. 2001). L'inhibition par le G6P est donc peu probable dans les tissus hétérotrophes. Par contre, il se peut qu'il en soit tout autrement pour les HKs cytosoliques des feuilles, puisqu'on y

rapporte des concentrations de G6P de 6 mM (Winter, H. et al. 1994). Les concentrations intracellulaires des métabolites étant très variables d'un tissu à l'autre (Farré, E. M. et al. 2001, Winter, H. et al. 1994), la régulation de certaines isoformes d'HKs pourraient donc être affectée en fonction de leur localisation tissulaire.

Malgré les limitations exposées plus haut, les travaux de Renz ont donc défini des bases solides sur les propriétés cinétiques des HKs. Suite à ces résultats, des questions par rapport à leur localisation cellulaire ont été soulevées, puisque la caractérisation des propriétés cinétiques ne permet pas de la déterminer.

1.3 Caractérisation des HKs 1 et 2 de tubercules de pomme de terre par transgénèse

Plusieurs HKs de pomme de terre ont été caractérisées par transgénèse. Pour créer les plantes transgéniques, Veramendi et al. (2002) ont isolé des ADNc codant pour StHK1 et StHK2 et, ont par la suite effectué leur caractérisation moléculaire (Veramendi, J. et al. 2002, Veramendi, J. et al. 1999). Outre les domaines de liaison pour le sucre et l'ATP, l'analyse des séquences de StHK1 et StHK2 a démontré la présence d'une région hydrophobe de 20 aa dans la région N-terminale de la protéine qui pourrait être utilisée selon Veramendi, J. et al. (2002) pour l'ancrage aux membranes. Cette région hydrophobe est aussi présente chez une isoforme d'HK d'épinard, localisée à la membrane externe des plastes (Wiese, A. et al. 1999)

1.3.1 HK1

Suite à la purification partielle de Renz (1993), Veramendi et al. (1999) a généré des plants de pomme de terre transformées avec l'ADNc codant pour StHK1 (X94302; StHXK1_O64390) (Veramendi, J. et al. 1999) en orientation sens et antisens. Une purification partielle en deux étapes de l'activité HK dans les tubercules de pommes de terre transgéniques a été faite en utilisant des étapes développées par Renz et al. (1993). Le profil d'éluion coïncide avec celui de Renz et al. (1993), et les deux pics d'activité suite à la première colonne de cellulose ont été attribués aux isoformes HK1 et HK2 précédemment isolées par Renz et al. (1993). Cette approche a permis d'observer un phénotype pour la sous expression et la surexpression de l'isoforme StHK1. Le niveau d'expression de StHK1 affecte le nombre de tubercule et leur grosseur, mais n'affecte pas de manière significative le niveau d'hydrate de carbone ni le niveau des métabolites dans les tubercules. Par contre le niveau d'expression semble avoir un effet sur le niveau d'amidon et de Glc dans les feuilles. Suite à ces observations il a été proposé que cette isoforme soit importante pour phosphoryler le Glc exporté des chloroplastes la nuit, ce qui expliquerait que la répression de son activité entraîne l'augmentation des niveau de Glc et d'amidon dans les feuilles (Veramendi, J. et al. 1999). Cette isoforme aurait, selon Veramendi et al., (1999), peu d'effet sur le métabolisme dans le tubercule.

1.3.2 HK2

Veramendi et al. (2002) ont ensuite généré des plantes sens et antisens à partir de l'ADNc codant pour StHK2 (AF106068; StHXK2_Q9SQ76) (Veramendi, J. et al. 1999). Tout comme pour l'isoforme StHK1, les résultats de l'effet du niveau de l'expression sur la

production, le nombre de tubercule ou leur grosseur n'est pas significatif tout comme pour les niveaux d'hydrates de carbone et des métabolites.

1.3.3 Interprétation des expériences de transgénèse

Selon les résultats exposés ci-dessus, l'altération de l'activité de StHK2, tout comme pour celle de StHK1, n'affecte pas le métabolisme de l'amidon dans le tubercule de la pomme de terre (Veramendi, J. et al. 2002). Cependant, ces analyses ont été faites sur des tubercules matures cueillis à partir de plants de pomme de terre déjà sénescents (Veramendi, J. et al. 1999) ou bien des plants dont l'âge varie de 2 à 3 mois (Veramendi, J. et al. 2002) ce qui ne correspond pas à l'âge des tubercules utilisés par Renz et al. (1993). En plus de leur rôle catalytique de phosphorylation des hexoses, il a également été démontré que les HKs ont aussi un rôle dans la signalisation du Glc (Dai, N. et al. 1999, Jang, J. C. et al. 1997). L'HK n'est pas seulement responsable de la catalyse de la phosphorylation du Glc, elle est aussi responsable du "glucose sensing". Comparativement aux mammifères, le métabolisme végétal du sucre par-delà la phosphorylation du Glc n'est pas nécessaire pour la signalisation du sucre (Jang, J. C. et al. 1997, Jang, J. C. and Sheen, J. 1994, Pego, J. V. et al. 1999) et la présence de l'HK est nécessaire pour réguler l'expression de gènes (Pego, J. V. et al. 2000). Une petite quantité d'HK se retrouve d'ailleurs dans le noyau (Cho, Y. H. et al. 2006). L'analyse du mutant dépourvu d'activité catalytique (*gin2*) a permis de démontrer que les fonctions catalytiques et de signalisation sont indépendantes l'une de l'autre. En effet, *gin2*, un mutant dépourvu de son site catalytique, peut encore accomplir ses fonctions de signalisation (Moore, B. et al. 2003).

1.4. Les isoformes d’HKs ont différentes localisations subcellulaires

Chez *Arabidopsis thaliana* (Jang, J. C. et al. 1997, Karve, A. et al. 2008), l’épinard (Wiese, A. et al. 1999), le tabac (Giese, J. O. et al. 2005), la mousse *Physcomitrella patens* (Olsson, T. et al. 2003), la pomme de terre (Claeyssen, E. et al. 2006, Veramendi, J. et al. 2002, Veramendi, J. et al. 1999) et la tomate *Solanum Lycopersicum* (Dai, N. et al. 2002, Damari-Weissler, H. et al. 2006, Menu, T. et al. 2001), plusieurs isoformes d’HKs ont été identifiées à partir de différents tissus. Avec l’utilisation de différentes approches telles que le fractionnement subcellulaire et la visualisation de protéines étiquetées avec la GFP, il a été possible d’associer l’activité HK aux mitochondries et aux plastes (Balasubramanian, R. et al. 2007, Camacho-Pereira, J. et al. 2009, Dai, N. et al. 2002, Damari-Weissler, H. et al. 2006, Damari-Weissler, H. et al. 2007, Giege, P. et al. 2003, Giese, J. O. et al. 2005, Graham, J. W. et al. 2007, Karve, A. et al. 2008, Wiese, A. et al. 1999).

1.4.1 L’activité HK est associée à différents compartiments cellulaires

Renz et al. (1993) a suggéré qu’il y avait trois isoformes d’HKs dans les tubercules de pommes de terre. Par la suite, Wiese et al. (1999) a identifié 3 pics d’activité HK dans les feuilles d’épinard, associés aux membranes chloroplastiques ou mitochondriales. Ils ont démontré, à l’aide du fractionnement cellulaire, que l’activité HK pouvait être extraite sous forme soluble ou membranaire (da-Silva, W. S. et al. 2001).

Les formes membranaires ont été associée aux mitochondries et aux vésicules de l'appareil de Golgi ce qui appuie certains résultats de Galina et al. (1995) et de Wiese et al. (1999). L'activité HK est donc associée à différents compartiments cellulaires et les isoformes se distinguent par leur différente sensibilité à l'ADP (Galina, A. et al. 1995) et leurs différentes propriétés cinétiques (da-Silva, W. S. et al. 2001). Chez le riz, 9 gènes d'HKs ont été isolés et la distribution spatiale des protéines encodées a été examinée. Différentes isoformes d'HKs se retrouvent donc à l'intérieur d'une plante, dans différents tissus (Cho, J. I. et al. 2006, da-Silva, W. S. et al. 2001, Galina, A. et al. 1995, Renz, A. et al. 1993). La multitude d'isoformes et le large spectre d'expression dans les tissus et les organes végétaux en fonction du niveau de développement suppose des rôles distincts et une régulation différente pour chacune des isoformes (Claeyssen, E. and Rivoal, J. 2007). Comme il sera vu plus tard, l'implication des différentes isoformes d'HKs dans le métabolisme va varier en fonction de leur localisation intracellulaire.

1.4.2 L'approche bioinformatique d'Olsson et al. (2003)

1.4.2.1 La séquence N-terminale : peptide signal ou domaine d'ancrage

On sait désormais que les HKs se retrouvent soit ancrées aux membranes externes des plastes ou des mitochondrie, ou solubles à l'intérieur des plastes (Giege, P. et al. 2003, Giese, J. O. et al. 2005, Wiese, A. et al. 1999). C'est la séquence peptidique à l'extrémité N-terminale qui permet de prédire leur localisation intracellulaire (Olsson, T. et al. 2003). Les HKs ont une séquence N-terminal hydrophobe qui sert à l'ancrage aux membranes des plastes et des mitochondries ou bien un peptide signal qui les dirige vers l'intérieur des plastes (Balasubramanian, R. et al. 2007, Claeyssen, E. et al. 2006, Damari-Weissler, H. et

al. 2007, Giese, J. O. et al. 2005, Kandel-Kfir, M. et al. 2006, Olsson, T. et al. 2003, Wiese, A. et al. 1999).

La séquence d'acides aminés en N-terminal est nécessaire pour cibler l'HK vers la membrane de la mitochondrie puisque qu'une délétion du domaine N-terminal entraîne la localisation de la protéine dans le cytosol (Balasubramanian, R. et al. 2007, Damari-Weissler, H. et al. 2006, Kandel-Kfir, M. et al. 2006, Kim, M. et al. 2006). Il en est de même pour la délétion de l'extrémité N-terminale des isoformes solubles localisées à l'intérieur des plastes (Damari-Weissler, H. et al. 2006, Olsson, T. et al. 2003). Le peptide signal en N-terminal est donc nécessaire pour le ciblage vers le stroma et serait clivé une fois l'HK importée dans les plastes (Giese, J. O. et al. 2005).

L'arrivée de nouvelles méthodes a grandement facilité l'étude de l'HK. Le fractionnement cellulaire (Giege, P. et al. 2003, Olsson, T. et al. 2003, Wiese, A. et al. 1999), l'utilisation de protéines de fusion avec la GFP (Damari-Weissler, H. et al. 2006, Giese, J. O. et al. 2005, Kandel-Kfir, M. et al. 2006) ainsi que les micropuces à ADN (Claeyssen, E. and Rivoal, J. 2007) ont permis de connaître la localisation subcellulaire et le patron d'expression des différentes isoformes d'HKs. Ces données couplées avec l'étude de plantes transgéniques exprimant différents niveaux d'expression d'HKs ainsi que l'utilisation de protéines recombinantes a permis de préciser certains des rôles joués par les HKs (Cho, Y. H. et al. 2006, Dai, N. et al. 1999, Jang, J. C. et al. 1997, Moore, B. et al. 2003).

Une approche bioinformatique a permis de classer les HKs végétales en deux sous-groupes, celles de type A et de type B (Olsson, T. et al. 2003). Les HKs de type A se retrouvent solubles à l'intérieur de plastides et celles de types B sont ancrées aux membranes externes des plastides ou des mitochondries. Ainsi, selon ces données, la séquence N-terminale d'une isoforme suffit pour prédire sa localisation cellulaire. Toujours selon ce travail, les isoformes présentes dans le cytosol seraient toutes associées à un système membranaire. Certaines des localisations prédites par les analyses des séquences N-terminales ont été confirmées expérimentalement soit par fractionnement cellulaire (Giege, P. et al. 2003, Wiese, A. et al. 1999), par la localisation d'une fusion HK:GFP (Balasubramanian, R. et al. 2007, Cho, J. I. et al. 2006, Damari-Weissler, H. et al. 2007, Damari-Weissler, H. et al. 2006, Giese, J. O. et al. 2005, Kandel-Kfir, M. et al. 2006, Karve, A. et al. 2008, Kim, M. et al. 2006, Olsson, T. et al. 2003) ou par immunodétection (Balasubramanian, R. et al. 2007, Karve, A. et al. 2008).

1.4.2.2 Contradictions de la localisation

Suite au fractionnement et à l'utilisation d'HK fusionnées à la GFP, des isoformes solubles dans le cytosol ont été rapportées chez deux monocotylédones, le riz et le maïs (Cho, J. I. et al. 2006, da-Silva, W. S. et al. 2001, Galina, A. et al. 1995). Mais, selon la classification d'Olsson et al. (2003) les HKs sont membranaires ou solubles dans les plastides. Les analyses de séquences chez les dicotylédones montrent qu'elles ont un peptide signal ou un domaine d'ancrage (Olsson, T. et al. 2003). Des quatre isoformes d'HKs identifiées jusqu'à maintenant chez la tomate et localisées à l'aide de la GFP, une est soluble dans les plastides et trois sont ancrées dans les membranes externes des mitochondries, mais aucune n'est soluble dans le cytosol (Damari-Weissler, H. et al. 2006, Kandel-Kfir, M. et al. 2006).

Les isoformes d'HKs identifiées jusqu'à présent chez les dicotylédones ont soit un domaine d'ancrage ou un peptide signal pour les plastes (Olsson, T. et al. 2003). La présence d'isoformes solubles dans le cytosol semble donc peu probable chez les dicotylédones (Damari-Weissler, H. et al. 2006). Les expériences de localisation subcellulaire supportent cette idée, à part l'activité HK associée au cytosol rapportée par Wiese et al. (1999).

Certaines des données de la littérature sont en contradiction pour ce qui est de la localisation des HKs à la surface externe des plastes. Bien que le fractionnement cellulaire montre que SoHXX1 est associée aux membranes des plastes (Wiese, A. et al. 1999), l'expression de la protéine de fusion SoHXX1::GFP dans des protoplastes suggère plutôt que cette isoforme est associée aux mitochondries (Damari-Weissler, H. et al. 2007) ce qui laisse croire que les HKs que l'on croyait associées aux plastes se retrouveraient plutôt dans le stroma. Il est possible que les résultats de Wiese et al. (1999) soient dû à la contamination par d'autres systèmes membranaires lors de l'isolement des plastes, bien qu'il soit aussi possible que la construction SoHXX1 ::GFP affecte le ciblage de la protéine vers la membrane externe des plastes.

1.4.2.3 Les limites de l'approche bioinformatique

Deux isoformes d'HKs de riz (monocotylédone) n'ont ni le peptide transit pour les plastes, ni le domaine d'ancrage aux membranes. La localisation par GFP indique qu'une de ces isoforme d'HK chez le riz se retrouve soluble dans le cytosol (Cho, J. I. et al. 2006). Le génome de la tomate n'ayant pas encore été complètement séquencé, il n'est pas impossible qu'il y ait d'autres isoformes, et qu'une d'elles puissent être solubles dans le cytosol. Les logiciels qui prédisent la localisation cellulaire sont de bons outils, mais on ne peut pas

s'appuyer uniquement sur ces derniers pour tirer des conclusions définitives. Par exemple, l'analyse du N-terminal AtHXK1 avec TargetP1.1, prédit qu'elle est une isoforme de type B (Claeysen, E. and Rivoal, J. 2007, Olsson, T. et al. 2003), mais cette isoforme se retrouve aussi dans le noyau, (Cho, Y. H. et al. 2006, Yanagisawa, S. et al. 2003) bien que les programmes de prédiction tels que PredictNLS ou LOCtree n'identifient pas de signal de localisation nucléaire (NLS) dans la séquence de l'HK. Ceci implique que l'isoforme nucléaire pourrait être transportée dans le noyau en étant associée à une autre protéine portant un NLS. Ces données démontrent que l'on ne connaît pas encore complètement les mécanismes qui déterminent tous les mécanismes de localisation cellulaire pour les HKs et les logiciels de prédictions ne sont pas parfaits. Ainsi, le modèle d'Olsson et al. (2003) ne permet pas de classer toutes les isoformes d'HKs du riz. Il est donc nécessaire de démontrer la localisation cellulaire des HKs de façon expérimentale (Peeters, N. and Small, I. 2001).

1.4.3 Évolution et rôles proposés des HKs de types A et B

Les HKs de types B seraient une innovation des plantes et dériveraient des HKs de type A qui sont plus ancestrales (Olsson, T. et al. 2003). Bien que la phylogénie des séquences en N-terminale montre deux branches distinctes d'isoformes de type B, la similarité des séquences suppose qu'en fait la séquence d'ancrage serait apparue une seule fois et aurait plutôt été transférée au deuxième groupe au cours de l'évolution (Olsson, T. et al. 2003). Ces différentes localisations intracellulaires des HKs pourraient refléter des fonctions distinctes. Par exemple les HKs de type A seraient importantes pour fournir le G6P aux voies métaboliques à l'intérieur des plastes, tandis que les HKs de types B seraient nécessaire pour phosphoryler le Glc exporté des plastes la nuit, et seraient une innovation pour maintenir le ratio G6P/Glc dans le cytosol et ainsi faciliter le transport du Glc vers le cytosol la nuit (Olsson, T. et al. 2003).

1.4.3.1 Les HKs de type A sont solubles dans les plastes

Les isoformes du stroma pourraient être plus importantes dans les tissus puits et pendant la nuit, lorsque les ressources sont limitées. Ainsi ces isoformes permettent de rendre le Glc directement disponible pour le métabolisme dans les plastes en fournissant le G6P suite à la dégradation de l'amidon (Giese, J. O. et al. 2005). En absence des HKs de type A, le Glc devrait être exporté vers le cytosol pour être phosphorylé et ensuite être réimporté vers les plastes sous forme de G6P (Olsson, T. et al. 2003). L'HK de type A fournirait entre autre la voie oxydative des pentoses phosphates (OPPP) suite à la dégradation de l'amidon ou suite à l'importation du Glc (Giese, J. O. et al. 2005), et jouerait donc un rôle important pour fournir les voies de biosynthèses dans les plastes (Karve, A. et al. 2008).

1.4.3.2 Les HKs de types B sont membranaires

Les logiciels de localisation cellulaire font la différence entre les isoformes de types A et de type B, mais ne différencient pas les isoformes B mitochondriales et plastidiques. Les isoformes de types B sont plutôt identifiées comme étant destinées à la voie de sécrétion sauf pour une isoforme dont les peptides de transit pour le chloroplaste sont reconnus (Claeyssen, E. and Rivoal, J. 2007). Les prédictions qui envoient les HKs vers la voie de sécrétion pourraient être causées par le domaine N-terminal qui est très hydrophobe (Olsson, T. et al. 2003). Il est aussi possible que certaines isoformes de types B aient un double ciblage comme il a déjà été rapporté pour d'autres protéines, et les logiciels ne sont pas faits pour différencier le ciblage des mitochondries et des plastes (Claeyssen, E. and Rivoal, J. 2007, Peeters, N. and Small, I. 2001).

Il a été proposé que l'ancrage de l'HK pourrait se faire sans l'aide de récepteurs (Rezende, G. L. et al. 2006), simplement par immersion de leur N-terminal hydrophobe dans les membranes (Wiese, A. et al. 1999). Due à la forte hydrophobicité du N-terminal, une interaction forte serait maintenue avec la membrane (Rezende, G. L. et al. 2006). Les HKs de type B ont un potentiel électrostatique positif à proximité de leur extrémité N-terminale, ce qui pourrait également faciliter leur association avec les membranes chargées négativement (Kandel-Kfir, M. et al. 2006).

1.4.3.2.1 Les HKs de type B ancrées aux membranes externes des plastes

Il y a deux voies spécialisées pour transporter les hydrates de carbone vers le cytosol et permettre la conversion de l'amidon en saccharose suite à la dégradation de l'amidon (Weise, S. E. et al. 2004). Le jour, l'exportation se fera surtout sous forme de trioses phosphates suite à la dégradation de l'amidon par la voie phosphorolytique. La nuit, c'est la voie hydrolytique qui est prédominante, et la forme principale de carbone exportée est sous forme d'hexose non-phosphorylé (Schleucher, J. et al. 1998, Weise, S. E. et al. 2004). Le maltose et le Glc sont les deux principales formes d'hydrates de carbones exportées des chloroplastes vers le cytosol la nuit (Weise, S. E. et al. 2004), et l'identification de leur transporteur a permis de le démontrer (Niittyla, T. et al. 2004, Weber, A. et al. 2000).

Bien que la forme d'hexose exportée la nuit ne soit pas phosphorylée, le ratio G6P/Glc reste quand même élevé dans le cytosol. Les HKs ancrées à la membrane externe des plastes permettraient la phosphorylation rapide du Glc à sa sortie des plastes suite à la dégradation de l'amidon (Cho, J. I. et al. 2006, Schleucher, J. et al. 1998, Weber, A. et al. 2000, Wiese, A. et al. 1999). Ceci permettrait le maintien d'un gradient de concentration de part et

d'autre de la membrane et favoriserait le transport du Glc (Claeyssen, E. et al. 2006, Weber, A. et al. 2000, Wiese, A. et al. 1999). La présence des HKs de part et d'autre de la membrane du plaste permettrait de maintenir le niveau de Glc faible et faciliterait ainsi le transport du Glc vers le cytosol pour sa conversion en saccharose pour le transport longue distance. La présence de ces isoformes de part et d'autre de la membrane plastidique, et la régulation de leur activité en fonction des conditions permet le changement de direction du transport du Glc (Olsson, T. et al. 2003). De plus l'HK membranaire des plastes permettrait l'énergisation du Glc exporté, et le G6P ainsi produit pourrait être utilisé par la voie de la glycolyse ou par la voie de la biosynthèse de la saccharose (Wiese, A. et al. 1999).

1.4.3.2.2 Les HKs de type B ancrées aux membranes externes des mitochondries

Chez les animaux, la liaison de l'HK avec la mitochondrie se fait à l'aide des canaux anioniques voltage-dépendant (VDAC). De plus, la liaison de l'HK avec la mitochondrie nécessiterait la région N-terminale de l'HK, en plus d'interactions avec différents domaines des VDAC (Arzoine, L. et al. 2009). Il a récemment été démontré chez *A. thaliana*, que l'HK végétale est aussi fortement associée aux VDAC (Balasubramanian, R. et al. 2007). Comparativement aux mammifères, un traitement avec du G6P ne permet pas de détacher l'HK de la membrane (Balasubramanian, R. et al. 2007, Rezende, G. L. et al. 2006). La comparaison entre les HKs végétales et animales indique que les régions N-terminales sont différentes et que la liaison avec la mitochondrie ne semble pas être permanente chez les animaux. La liaison de l'HK à la membrane externe des mitochondries chez les plantes et les mammifères ne suivrait donc pas les mêmes modalités fonctionnelles (Yamamoto, Y. T. et al. 2000). Par contre, comme il sera expliqué ultérieurement, leur implication dans le contrôle la mort cellulaire programmée pourrait avoir certaines analogies (Kim, M. et al. 2006).

1.4.3.3 Présence d'un métabolon glycolytique sur la membrane externe de la mitochondrie

Un métabolon d'enzymes glycolytiques, qui comprend l'HK se retrouvent à la surface externe de la membrane mitochondriale (Giege, P. et al. 2003). Cette proximité permet un apport privilégié de l'ATP mitochondrial à l'HK (Yamamoto, Y. T. et al. 2000), en plus de fournir le pyruvate directement au site de consommation (Giege, P. et al. 2003) et de faciliter la régénération rapide de l'ATP en recyclant l'ADP (Galina, A. et al. 1995, Wiese, A. et al. 1999).

Sur l'ensemble des protéines associées à la mitochondrie identifiées par analyse de spectrométrie de masse, on retrouve sept enzymes de la glycolyse et la mesure de l'activité enzymatique sur des mitochondries isolées détecte quant à elle toutes les enzymes de la glycolyse (Giege, P. et al. 2003, Graham, J. W. et al. 2007). La formation d'un métabolon glycolytique permettrait de créer une voie dédiée à la production de pyruvate directement au site de consommation. En effet, la formation du métabolon à la surface de la mitochondrie en fonction du taux de respiration et de certaines voies de biosynthèses, permettrait la canalisation des substrats et empêcherait la compétition des intermédiaires de la glycolyse avec d'autres voies. Ceci ferait en sorte que la respiration ne manque pas de substrat au profit d'une autre voie (Graham, J. W. et al. 2007). Puisque les isoformes de types B sont associées aux membranes externes des mitochondries (Damari-Weissler, H. et al. 2006, Damari-Weissler, H. et al. 2007, Kandel-Kfir, M. et al. 2006), il est possible qu'elles y soit liée en permanence tandis que d'autres enzymes s'y lieraient en fonction des conditions physiologiques (Giege, P. et al. 2003).

L'augmentation de la respiration cellulaire suite à l'ajout de Glc est probablement due à la génération d'ADP suite à la phosphorylation du Glc par les HKs mitochondriales (Galina, A. et al. 1995, Yamamoto, Y. T. et al. 2000). Cette association serait une façon de maintenir une relation entre la glycolyse et le système de régénération de l'ATP et ainsi assurer une réponse rapide de la cellule en fonction de la demande cellulaire de G6P (Galina, A. and da Silva, W. S. 2000, Graham, J. W. et al. 2007). En effet, le G6P produit par les isoformes mitochondriales serait principalement utilisé pour la formation de G1P et la synthèse des polysaccharides pour la biosynthèse de la paroi (Galina, A. and da Silva, W. S. 2000). Par exemple, dans les tissus en développement où la croissance est rapide, la présence de ces isoformes permettrait de fournir le G1P nécessaire à la biosynthèse de la paroi et permettraient le recyclage rapide de l'ADP (Yamamoto, Y. T. et al. 2000).

Les HKs mitochondriales étant plus sensibles à l'inhibition par l'ADP, il a été proposé que ces isoformes ne soient pas impliquées directement dans la voie de la glycolyse, mais serviraient plutôt à canaliser le Glc vers les voies de biosynthèses lorsque les conditions sont favorables (da-Silva, W. S. et al. 2001, Galina, A. and da Silva, W. S. 2000). L'inhibition de certaines HKs par l'ADP, servirait à contrôler l'utilisation du G6P qui est utilisé par la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Il s'agit d'un avantage pour la survie, car dans les conditions de stress où il y a peu de Glc ou d'ADP le peu d'hexoses sera principalement envoyé vers la voie de la glycolyse pour fournir de l'énergie à la cellule (da-Silva, W. S. et al. 2001, Galina, A. and da Silva, W. S. 2000). Il a aussi été proposé que, suite à l'inhibition de l'HK par l'ADP en condition hypoxique, la saccharose synthase serait favorisée pour produire des substrats pour la glycolyse, soit l'UDP-Glc et le Fru, et donc que l'HK ne serait tout simplement pas nécessaire dans ces conditions (Bouny, J. M. and Saglio, P. H. 1996). Un faible taux d'oxygène semble réprimer l'invertase au détriment de la saccharose synthase chez le maïs (Zeng, Y. et al. 1999). La substitution de la

consommation de l'ATP par le PPi lors de la dégradation du saccharose par la saccharose synthase serait un moyen de diminuer la consommation d'ATP et d'oxygène dans les tissus hypoxiques (Geigenberger, P. et al. 2000). De plus, chez le maïs, l'inhibition de l'HK par l'ADP est plus importante avec le Glc que le Fru. En condition hypoxique, la phosphorylation du Glc serait donc inhibée ce qui limiterait la formation de G6P. L'UDPG pyrophosphorylase permettrait la génération de G1P et d'UTP à partir de l'UDPG en consommant du PPi (Gibson, D. M. and Shine, W. E. 1983). Par contre le Fru produit par la saccharose synthase devrait encore être phosphorylé et former du F6P (Galina, A. et al. 1999).

La liaison de l'HK à la mitochondrie pourrait aussi être nécessaire pour la régulation de certaines fonctions mitochondriales telle la phosphorylation oxydative. Dans les cerveaux de rats, l'HK est préférentiellement liée à la membrane externe de la mitochondrie par les VDAC. La liaison est réversible et varie en fonction du niveau de G6P (Rezende, G. L. et al. 2006). Comparativement aux HKs végétales, les HKs animales sont inhibées par le G6P. L'accumulation de G6P suite à une incapacité du métabolisme à l'utiliser inhibe l'HK mitochondriale et interrompt le recyclage de l'ADP ce qui entraîne la mort cellulaire (da-Silva, W. S. et al. 2004). En effet, l'inhibition de la liaison entre l'HK et les VDAC entraînerait une cascade de signalisation pour la mort cellulaire (Arzoine, L. et al. 2009). Chez le tabac, la surexpression de l'HK augmente la résistance de la plante contre le stress oxydatif, et l'altération de l'expression d'un gène d'HK mitochondriale active la mort cellulaire programmée. L'HK chez les végétaux pourrait donc aussi être impliqué dans la régulation de la mort cellulaire programmée (Kim, M. et al. 2006).

Suite à l'augmentation de la respiration par un apport important en Glc, l'association de l'HK avec les VDAC, en plus de donner à l'HK un accès direct à l'ATP mitochondrial, permet le recyclage de l'ADP et apporte une défense contre le stress oxydatif qui peut mener à l'apoptose (da-Silva, W. S. et al. 2004). L'association de l'HK aux VDAC est essentielle car cette proximité permet l'apport rapide d'ADP à l'ATP synthase mitochondriale qui utilise le gradient transmembranaire de proton pour recycler l'ADP et ainsi diminuer le potentiel de membrane. Donc, la présence de l'HK jouerait un rôle dans la défense antioxydante en fournissant un apport constant d'ADP à la mitochondrie et contribuerait à faire diminuer le potentiel de membrane en modulant le flux d'électron de la chaîne respiratoire, ce qui conséquemment diminue la production de ROS (Camacho-Pereira, J. et al. 2009, da-Silva, W. S. et al. 2004, Meyer, L. E. et al. 2006).

Puisque les HKs sont liées aux VDAC (Balasubramanian, R. et al. 2007, Damari-Weissler, H. et al. 2007) la protection contre le stress oxydatif pourrait venir du contrôle de ces canaux par l'HK comme c'est le cas dans le cerveau de rat (da-Silva, W. S. et al. 2004). L'HK pourrait être impliquée dans la modulation de la libération des facteurs entraînant l'apoptose. En effet la liaison entre l'HK et les VDAC dans les cellules cancéreuses est impliquée dans la fermeture des canaux responsables de la libération du cytochrome c dans le cytosol et donc empêcherait l'apoptose (Azoulay-Zohar, H. et al. 2004). Certains résultats suggèrent que le mécanisme est le même chez les plantes (Kim, M. et al. 2006). Les VDAC étant trop petits pour laisser passer le cytochrome c, leur oligomérisation permettrait de créer un canal assez grand pour les faire passer. Il a été proposé que l'HK joue un rôle dans l'oligomérisation des VDAC et donc dans le contrôle de la libération de certains facteurs entraînant l'apoptose chez les végétaux (Hoogenboom, B. W. et al. 2007).

1.5 Le rôle de l'HK dans la signalisation du Glc

1.5.1 L'activité de signalisation du Glc est associée avec l'isoforme mitochondriale

L'HK impliquée dans la signalisation du Glc est une isoforme associée aux mitochondries (Balasubramanian, R. et al. 2007, Cho, Y. H. et al. 2006, Dai, N. et al. 1999, Jang, J. C. et al. 1997, Moore, B. et al. 2003, Rolland, F. et al. 2002, Rolland, F. and Sheen, J. 2005). Cet isoforme est plus sensible à l'ADP et au G6P, ce qui suggère un rôle dans la signalisation (da-Silva, W. S. et al. 2001). Il est possible que ce rôle dans la signalisation soit également associé avec leur localisation (Rezende, G. L. et al. 2006, Xiao, W. Y. et al. 2000). L'isoforme se liant aux VDAC pourrait intervenir dans la signalisation du Glc, et son interaction avec les filaments d'actine pourrait aussi jouer un rôle dans la signalisation (Balasubramanian, R. et al. 2007). Mais il reste quand même à clarifier les mécanismes impliqués.

La répression de plusieurs gènes photosynthétiques est déclenchée par certains hexoses (glucose, fructose, mannose et galactose), qui sont aussi des substrats de l'HK. Suite à ces observations, il a été proposé que l'HK ait une fonction de senseur de glucose (Jang, J. C. and Sheen, J. 1994). La capacité des plantes à détecter la concentration cellulaire en hexoses leur permettrait de moduler leur activité photosynthétique en contrôlant le niveau de transcription des gènes et assure ainsi un contrôle serré du budget énergétique (Pego, J. V. et al. 2000). Des résultats ont montré que le Glc module la photosynthèse, la croissance,

la sénescence ainsi que l'expression de gènes via l'HK (Dai, N. et al. 1999, Jang, J. C. et al. 1997, Xiao, W. Y. et al. 2000).

La molécule de signalisation est en fait le Glc et non un métabolite en aval dans la voie de la glycolyse (Jang, J. C. et al. 1997). La voie de signalisation du Glc est intimement reliée avec la voie de signalisation des hormones. Les effets observés du Glc sur la croissance et le développement de la plante reflètent un réseau complexe de signalisation chez les plantes qui est dirigé par l'entrée des nutriments, les hormones et les conditions de l'environnement. L'intégration des différents signaux par l'HK permet donc une réponse adéquate en fonctions de ces différents éléments (Moore, B. et al. 2003).

La mutation du site catalytique de l'HK n'affecte pas son rôle de senseur de glucose. Les HKs mutantes qui ne présentent aucune activité de phosphorylation, sont encore capable de remplir leur rôle de senseur de Glc et de moduler l'expression de gènes, la croissance et la sénescence (Moore, B. et al. 2003). La fonction de senseur de glucose de l'HK est donc indépendante de son activité catalytique.

La répression de la germination par le Man chez *A. thaliana* se fait via l'HK et un traitement au mannoheptulose renverse cette inhibition. Il est possible que la liaison du Glc avec l'HK entraîne un changement de conformation qui réprime l'expression de gènes. La liaison avec le mannoheptulose pourrait empêcher le changement de conformation nécessaire pour la fonction de senseur de glucose de l'HK (Pego, J. V. et al. 1999).

La surexpression de *AtHXX1* dans les plantes transgéniques d'*A. thaliana*, entraîne une hypersensibilité au glucose et la répression de l'expression des gènes chlorophylle a/b binding protein (CAB) et ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small unit (RBCS) (Jang, J. C. et al. 1997). Les plantes antisens pour ce même gène sont hyposensibles aux traitements au Glc et surexpriment ces mêmes gènes. Le gène *AtHXX1* a donc été proposé comme étant impliqué spécifiquement dans la répression et l'activation de gènes (Jang, J. C. et al. 1997). Par la suite, la présence de *AtHXX1* a été démontrée à l'intérieur du noyau où elle contrôle la dégradation de EIN3, un facteur de transcription pour la signalisation de l'éthylène (Yanagisawa, S. et al. 2003). La régulation de la dégradation d'EIN3 est modulée par le Glc par l'intermédiaire d'*AtHXX1*, ce qui suppose que l'HK a un rôle dans la modulation de la transcription de certains gènes à l'intérieur du noyau. Chez les mammifères le transport des GKs vers le noyau se fait en fonction des conditions physiologiques. Une fois dans le noyau, elles peuvent moduler l'expression des gènes mais la façon dont les HKs sont transportées vers le noyau n'est pas encore connue (Frommer, W. B. et al. 2003).

Dans le noyau, *AtHXX1* se retrouve liée directement à deux autres protéines, VHA-B1 et RPT5B (Cho, Y. H. et al. 2006). La formation de ce complexe est nécessaire pour la liaison aux promoteurs et peut se faire en absence du site catalytique de l'HK. La fonction de l'HK à l'intérieur du noyau est donc clairement non-catalytique. Les trois protéines de ce complexe se retrouvent habituellement dans différents compartiments cellulaires et ont une tout autre fonction : l'HK est associée à la membrane externe de la mitochondrie, la VHA-B1 est une sous-unité d'une ATPase vacuolaire et la RPT5B fait partie de la sous-unité régulatrice 19S du complexe d'un protéasome. Mais une fois dans le noyau, ces trois protéines semblent agir de façon synergétique en fonction du niveau de luminosité et de la concentration en Glc pour moduler le développement de la plante et l'expression de

plusieurs gènes. L'interaction spécifique à l'intérieur du noyau pourrait assurer une spécificité de l'action du complexe dans la voie du senseur de Glc. Ainsi la fonction de l'HK serait fonction de sa localisation cellulaire (Cho, Y. H. et al. 2006).

Deux orthologues d'*AtHXK1* ont été identifiés chez le riz, *OsHXK5* et *OsHXK6*. Les protéines codées par ces gènes ont un double ciblage vers la mitochondrie et le noyau. Ces isoformes présentent les mêmes caractéristiques pour la signalisation et la perception du Glc : leur surexpression augmente la répression de gènes photosynthétiques et entraîne l'hypersensibilité suite aux traitements aux Glc, et leur expression peut compléter le mutant *gin2-1* insensible au Glc. De plus, tout comme pour *AtHXK1*, la fonction de senseur de glucose est indépendante de son activité catalytique. Ces résultats suggèrent une double fonction similaire à *AtHXK1* (Cho, J. I. et al. 2009). Des HKs avec un rôle de senseur de Glc pourraient donc se retrouver chez plusieurs espèces de plantes.

La surexpression de *AtHXK1* dans la tomate supporte aussi le rôle de l'HK comme senseur de glucose chez la tomate (Dai, N. et al. 1999). Par contre la surexpression de deux isoformes d'HKs chez la pomme de terre ne semble pas démontrer ce rôle (Veramendi, J. et al. 2002, Veramendi, J. et al. 1999). Ces observations suggèrent que les HKs caractérisées jusqu'à présent chez la pomme de terre n'ont pas de fonctions de signalisation, mais il est probable que cette fonction soit accomplie par certaines isoformes en particulier.

Balasubramanian et al. (2007) a montré l'interaction de l'HK avec les filaments d'actine chez *A. thaliana*, et cette liaison pourrait avoir un rôle dans la signalisation du Glc. En effet, des traitements qui provoquent la désorganisation des filaments d'actines entraînent une

perte de la fonction de signalisation au Glc ce qui suggère que cette fonction de l'HK nécessite préalablement une interaction avec le cytosquelette d'actine. De plus un traitement au Glc affecte l'organisation des filaments d'actine et laisse supposer leur implication dans la signalisation du Glc. Suite à l'obtention de ces résultats, deux mécanismes ont été suggérés pour expliquer le rôle de l'actine dans la signalisation du Glc (Balasubramanian, R. et al. 2007). Le premier suggère que l'actine G, ou une protéine associée, puissent aller contrôler l'expression de gènes dans le noyau suite à la désorganisation de l'actine. Dans un second modèle, le Glc augmenterait la liaison des polysomes à l'actine et par le fait même contrôlerait la traduction de certains gènes.

1.6 Certaines isoformes HK n'ont pas d'activité catalytique

Il y a chez *A. thaliana*, six isoformes d'HKs, et trois d'entre elles n'ont pas d'activité catalytique (Karve, A. et al. 2008). Il en est de même chez le champignon *A. nidulans* qui possède quatre isoformes dont trois n'ont pas d'activité catalytique. Deux de ces HKs sont par contre des régulateurs négatifs pour la sécrétion de protéases suite à une privation en carbone : AnHXKD se retrouve dans le noyau et AnHXKC se retrouve associée aux mitochondries. Bien que ces isoformes n'aient pas d'activité catalytique, l'analyse phylogénique suggère qu'elles auraient évolué à partir de ces dernières (Bernardo, S. M. et al. 2007).

Des six isoformes d'HKs d'*A. thaliana*, cinq sont associées aux mitochondries et une seule se retrouve soluble dans le stroma. La présence de transcrits et leur niveau d'expression similaire dans plusieurs tissus, ainsi que leur association avec les mitochondries suggèrent que ces isoformes pourraient être impliquées dans la signalisation au glucose. Tout comme

chez *A. nidulans*, ces isoformes pourraient avoir un rôle de signalisation plutôt qu'un rôle catalytique. Les modifications dans les séquences de nucléotides auraient entraîné une spécialisation de la fonction de signalisation au détriment de la fonction catalytique (Karve, A. et al. 2008). AtHXK1 pourrait donc ne pas être la seule à avoir un rôle régulateur chez *A. thaliana*. Chez *O. sativa*, il y aurait possiblement au moins deux isoformes analogues à AtHXK1 avec une fonction catalytique ainsi qu'une fonction de signalisation. La présence d'HKs présentant des caractéristiques de senseur de Glc pourrait donc se retrouver chez plusieurs espèces de plantes et suggère l'évolution d'un rôle conservé chez plusieurs espèces de plantes (Cho, J. I. et al. 2009).

Préambule

Mon projet de maîtrise consistait à purifier et caractériser une isoforme d'HK. Comme il sera mentionné ultérieurement, un autre groupe avait partiellement purifié l'HK avant moi, un protocole de purification était donc disponible. La première partie de mon projet, présenté dans le chapitre 2, a donc été d'optimiser ce protocole d'extraction pour limiter les pertes d'HK à cette étape.

Cette optimisation, ainsi que les changements apportés aux étapes de chromatographie de Renz et al. (1993), ont permis d'obtenir pour la première fois une HK végétale purifiée à homogénéité sous forme native. La caractérisation des propriétés cinétiques de cette enzyme ainsi que l'analyse du séquençage par MS/MS a par la suite permis d'émettre des hypothèses sur sa localisation et la façon dont cette enzyme pourrait être modulée dans la cellule. Les résultats de la purification et de la caractérisation sont présentés dans le chapitre 3.

Beaucoup d'informations avaient été accumulées lors de la période exploratoire précédant la purification de la première isoforme d'HK. Ces informations ont par la suite permis de purifier partiellement une deuxième isoforme d'HK. Les résultats de cette purification sont présentés dans le chapitre 4 avec les résultats préliminaires de sa caractérisation enzymatique.

Chapitre 2 : Mise au point d'un milieu d'extraction permettant de protéger l'hexokinase de tubercule de pomme de terre contre la dégradation

2.1 Introduction

La purification d'une protéine peut prendre de quelques jours jusqu'à plus d'une semaine à compléter. Il est donc primordial de prendre des mesures pour éviter la dégradation des protéines lors de l'extraction initiale et pendant la purification en tant que telle. Ceci est d'autant plus crucial pour le travail mené sur l'hexokinase (HK) présenté dans ce mémoire. En effet, l'un des buts de ce projet était de caractériser les propriétés cinétiques de l'enzyme purifiée. Étant donné que des modifications dans la structure d'une protéine peuvent avoir pour conséquence une modification des propriétés de cette protéine, il est important de protéger le plus possible la structure native de l'enzyme étudiée. Dans tout ce processus, l'extraction est d'une importance cruciale. Lors de cette étape, on détruit tout les composants tissulaires et cellulaires pour libérer les protéines sous forme soluble. Il résulte de cette étape un mélange du contenu des compartiments cellulaires. Ainsi, des protéines qui ne seraient jamais en contact *in vivo* se retrouvent de façon artéfactuelle dans le même milieu. Des protéases peuvent, par exemple, modifier ou dégrader l'enzyme que l'on tente de purifier (Crowley, V. et al. 2005, Rivoal, J. et al. 2001, Walker, R. P. and Leegood, R. C. 1995). Il en est de même avec des petites molécules qui peuvent être générées ou libérées lors de l'extraction et avoir un effet délétère sur l'activité ou la structure de la protéine d'intérêt. Par exemple, le tubercule de pomme de terre contient des niveaux élevés d'acide chlorogénique, un composé phénolique très réactif et délétère pour les protéines lors de l'extraction (Dao, L. and Friedman, M. 1992). Une bonne étape d'extraction devrait

donc permettre d'éliminer ou de neutraliser au maximum les composantes néfastes qui pourraient entraîner la dénaturation ou la dégradation de la protéine d'intérêt et une perte de son activité enzymatique. La mise au point du tampon d'extraction a donc une grande importance pour contrôler au mieux tous les facteurs et les éléments qui pourraient conduire à la dénaturation ou à la dégradation des protéines. Par exemple l'ajout d'inhibiteurs de protéases permet de limiter la dégradation enzymatique des protéines. Il existe plusieurs classes de protéases chez les plantes (van der Hoorn, R. A. 2008) (voir également la base de données MEROPS : <http://merops.sanger.ac.uk>). Chaque classe de protéases est ciblée par des inhibiteurs spécifiques (Deutscher, M. P. 1990). Lors de la mise au point d'un milieu d'extraction, il convient donc d'établir quel(s) inhibiteur(s) de protéase sera (seront) à même de bien contrôler le problème de protéolyse. Ceci se fait à l'aide d'une stratégie d'essai et d'erreur. En ce qui concerne la protection contre des métabolites libérés pendant l'extraction, l'ajout de polyvinylpyrrolidone (PVPP) en quantité bien dosée est important afin de piéger les composés phénoliques particulièrement abondants dans les extraits végétaux. Ces composés peuvent se lier de façon covalente aux protéines et avoir un effet dénaturant (Gegenheimer, P 1990). L'élaboration du tampon d'extraction est donc une étape de mise au point importante avant de commencer la purification de protéine.

Bien avant de commencer à purifier l'HK de pomme de terre, le groupe de Mark Stitt avait déjà fait une purification partielle de cette enzyme (Renz, A. et al. 1993). Ces auteurs avaient mis au point un tampon d'extraction. Lors des étapes préliminaires de mon projet de maîtrise, nous avons remarqué que l'HK extraite en utilisant le protocole établi par Renz et al. (1993) était peu stable. Le but des expériences décrites ci-dessous était d'évaluer et, le cas échéant, d'optimiser le tampon d'extraction de Renz et al. (1993) afin que l'étape d'extraction de l'HK à partir de tubercules de pomme de terre donne une préparation en HK relativement stable et non dégradée. Nous avons choisi d'évaluer les différentes conditions d'extraction en mesurant l'activité HK totale, en analysant les extraits par immunoblot à

l'aide d'IgG anti-HK purifiées par affinité avec de l'HK recombinante (Claeyssen, E. et al. 2006) et en séparant les isoformes d'HKs contenues dans l'extrait sur une colonne de butyl sepharose. Cette matrice nous a en effet permis lors de tests préliminaires de séparer quatre isoformes d'HK à partir des tubercules de pomme de terre.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Produits chimiques et matériel végétal

Les tampons, les réactifs et les préparations chimiques utilisés étaient de qualité analytique, et proviennent de chez Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA), Fisher Scientific (Neapean, ON, Canada) GE Healthcare (Baie D'Urfé, QC, Canada) ou Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). L'eau utilisée pour préparer toutes les solutions a été purifié par procédé Milli-Q (Millipore, Etobicoke, ON, Canada). Les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) Russet Burbank, utilisés pour la purification provenaient des Semences Élités du Québec (Pointe aux Outardes, QC, Canada).

2.2.2 Mesure de l'activité enzymatique et dosage des protéines

L'activité HK a été mesurée à 30°C dans un volume final de 200 µl par spectrophotométrie à l'aide d'un essai enzymatique couplé. Les essais enzymatiques ont été faits en suivant un protocole modifié de Martinez-Barajas, E et Randall, D.D. (1998) selon Claeyssen, E et al. (2006). Le tampon d'essai contenait 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 50 mM KCl, 0.3 mM NAD⁺, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM glucose, 5 mM DTT et 1.2 U/mL glucose-6-phosphate

déshydrogénase (EC 1.1.1.49). La réaction a été mesurée en suivant la réduction du NAD^+ à 340 nm à l'aide d'un lecteur de plaque VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Une unité (U) d'activité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 1 μmol de G6P par minute à 30 °C. La quantification des protéines a été faite en utilisant la méthode de Bradford (Bradford, M. M. 1976) à l'aide du réactif protein assay reagent de Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada) avec l'albumine de sérum bovin comme standard.

2.2.3 Tampons utilisés pour la chromatographie sur colonne Butyl Sepharose 4 Fast Flow

Les tampons suivants ont été utilisés: Tampon A : 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10% (v/v) glycérol et 30 % (saturation) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Tampon B: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT et 10% (v/v) glycérol.

2.2.4 Extraction de l'HK des tubercules de *S. tuberosum* et chromatographie sur colonne de Butyl Sépharose

Toutes les manipulations ont été faites à 4°C. Les tubercules de pommes de terre ont rapidement été pelés et coupés, puis homogénéisés pendant 1 min avec le tampon d'extraction. Deux conditions expérimentales ont été utilisées pour extraire l'activité HK. La première extraction a été effectuée avec le tampon d'extraction de Renz et al. (1993), mis à part du fait que le tampon Hepes KOH (pH 8,0) a été remplacé par du tampon Tris-HCl (pH 8,0). La composition de ce tampon d'extraction était : 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothéitol (DTT), 1 mM benzamidine, 1

mM acide ϵ -amino-n-caproïque (ϵ ACA), 0,5 mM fluorure de phenylmethylsulphonyle (PMSF), 2% (p/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). La deuxième condition d'extraction a été mise au point après plusieurs modifications faites grâce à une stratégie d'essais/erreurs. Ce tampon d'extraction augmentait la stabilité de l'activité HK (voir plus bas). Le tampon contenait 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 10 mM KCl, 5% (p/v) PVPP, 10% (v/v) glycérol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 mM acide ϵ -amino-n-caproïque, 2 mM PMSF et 2.16 μ M leupeptine. Une homogénéisation supplémentaire a ensuite été faite sur ces deux mélanges à l'aide d'un homogénéisateur polytron. Les homogénats ont été filtrés avec un papier Whatman #1. Le filtrat a été centrifugé 20 min à 4°C et 10 000 g. Le surnageant a été amené à 30% (p/v) $(NH_4)_2SO_4$ en ajoutant du sel sous agitation constante pendant 30 min. L'extrait a par la suite été centrifugé 20 min à 4°C et 10 000 g. Le surnageant a été chargé sur une colonne Butyl Sepharose 4 Fast Flow (1 x 8 cm) préalablement équilibrée avec le tampon A. La colonne a été lavée avec 3 volumes de colonne de tampon A à une vitesse de 0.5 ml·min⁻¹, et ensuite éluée avec un volume de 54 ml suivant un gradient de tampon B dans le tampon A entre 0 et 100%, suivi de 18 ml de tampon B dans des conditions isocratiques. Après l'extraction et avant d'amener le surnageant à 30% (p/v) $(NH_4)_2SO_4$, une aliquote de l'extrait brut de chacune des extractions a été récolté puis dessalé dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT et 20% (v/v) glycérol en utilisant une colonne Sephadex G-25 de 10 ml préalablement équilibrée avec le tampon de dessalage. Chaque échantillon dessalé a été conservé à 4°C. L'activité enzymatique a été mesurée tout de suite (temps 0) après l'extraction et après 24 h, 48 h et 72 h de stockage. Une aliquote a aussi été dénaturé immédiatement après l'extraction et après 24 h, 48 h et 72 h de stockage pour une analyse par immunodétection.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Stabilité de l'activité enzymatique dans le temps après extraction

Étant donné que l'extraction de l'HK effectuée selon le protocole de Renz et al. (1993) donnait une activité HK peu stable (Figure 1), nous avons opéré des changements dans la nature et/ou les concentrations des composantes du milieu utilisé par Renz et al. (1993). Les modifications qui apportaient une amélioration à la stabilité de l'activité HK extraite ont été sélectionnées pour générer un milieu d'extraction amélioré. Afin de comparer le milieu de Renz et al. (1993) et notre milieu amélioré et également pour valider l'utilisation de ce milieu amélioré, nous avons extrait l'HK à partir de tubercules de pomme de terre dans les 2 milieux dont la composition est décrite ci-dessus. Des essais enzymatiques ont été effectués immédiatement après extraction et après 24h, 48h et 72h de stockage des extraits à 4°C pour vérifier si l'utilisation de l'un ou l'autre des tampons d'extraction avait un effet sur la conservation de l'activité enzymatique. Des résultats représentatifs des essais enzymatiques réalisés sur les extraits dessalés sont montrés dans la figure 1. Il est à noter que les extractions dans les 2 conditions ont été réalisées le même jour l'une à la suite de l'autre et que les essais ont été faits en même temps pour minimiser les variations expérimentales dans la mesure d'activité. Suite à l'utilisation du tampon de Renz et al. (1993) il y a une nette baisse d'activité après 48 h de stockage à 4°C. Par contre, l'utilisation du tampon amélioré stabilise l'activité HK jusqu'à 72 h après extraction. En effet, dans ces conditions, il n'y a aucune perte d'activité détectable. Nous avons apporté des modifications assez importantes à la composition du milieu d'extraction de Renz et al. (1993). Ces modifications nous permettent d'améliorer la qualité de la préparation. Nous pouvons émettre quelques hypothèses pour expliquer ces résultats.

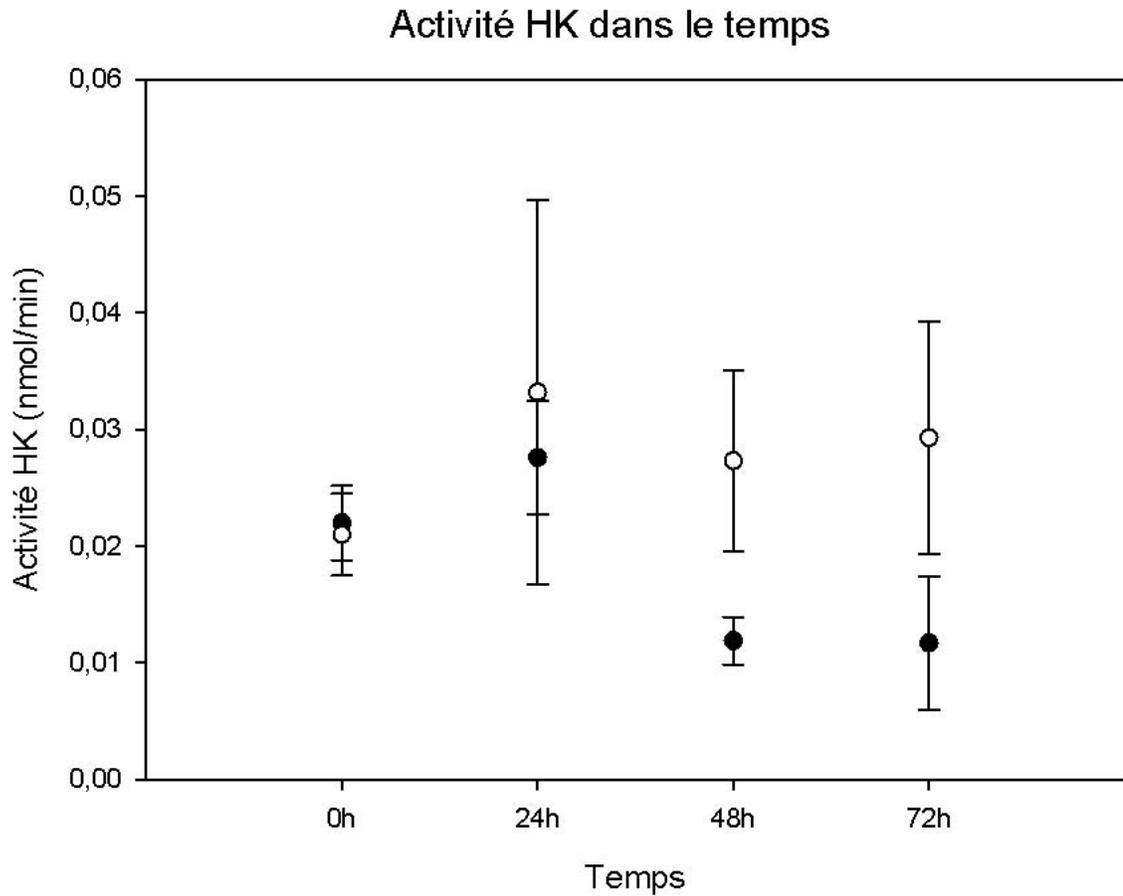


Figure 1 : Analyse de la stabilité de l'activité HK dans le temps suite à l'utilisation du tampon d'extraction amélioré ou du tampon d'extraction de Renz et al. (1993).

L'activité enzymatique de l'extrait d'HK est représentée en fonction du temps de stockage (0, 24h, 48h et 72h) et du tampon d'extraction utilisé. L'extraction et la mesure d'activité ont été faites tel que décrit dans la partie matériels et méthodes. Les symboles pleins (●) correspondent à l'extraction faite selon Renz et al. (1993) les symboles vides correspondent à l'extraction avec le tampon d'extraction amélioré (○).

Lors de l'extraction, les tissus sont broyés et les membranes sont dissociées. Tous les composants de la cellule se retrouvent donc mélangés. L'HK va donc se retrouver avec des molécules qui peuvent l'endommager. Les tissus végétaux en général, et les pommes de terre en particulier, contiennent beaucoup de composés phénoliques, produits du métabolisme secondaire. Ces molécules peuvent entraîner la dénaturation des protéines par création de liaisons covalentes avec des groupements réactifs des acides aminés (Dao, L. and Friedman, M. 1992, Delaplace, P. et al. 2009, Gegenheimer, P 1990). Lorsqu'un extrait végétal change de couleur au cours du temps pour devenir brun, c'est en général un signe de la présence de composés phénoliques oxydés. Lors de l'extraction avec le tampon de Renz et al. (1993), l'extrait prenait très rapidement une teinte brune comparativement à l'autre qui restait translucide même après 72h. L'augmentation de la concentration de DTT de 1 mM à 5 mM permet de diminuer l'oxydation et la réactivité des phénols. L'augmentation du pourcentage de PVPP de 2% à 5% (p/v) permet d'adsorber et de se débarrasser d'une plus grande quantité de composés phénoliques. Il est fort probable que l'HK soit particulièrement sensible à la dénaturation par les phénols oxydés générés lors de l'extraction. Un meilleur contrôle de ces molécules a permis d'augmenter la stabilité de l'enzyme. Le DTT est un agent réducteur, son utilisation permet aussi d'éviter l'oxydation des résidus SH des cystéines dans les protéines. Il est donc possible qu'un ou plusieurs résidus SH de l'HK doivent rester dans un état réduit pour améliorer la stabilité et maintenir l'activité de l'enzyme. Les protéases libérées au cours de l'extraction peuvent cliver les enzymes et entraîner la perte de leur activité. Un inhibiteur de protéase à cystéine (leupeptine) a été ajouté au tampon d'extraction et la concentration d'un inhibiteur de protéases à sérine (PMSF) a été augmentée de 0,5 mM à 2 mM. En plus de chélater les cations métalliques divalents, l'EDTA agit aussi comme inhibiteur de métalloprotéases (Sussman, M. et al. 2009). Les cations métalliques peuvent aussi être une menace pour les enzymes car leur faible taille et leur charge leur permet d'aller facilement s'associer avec les résidus chargés négativement sur les enzymes. Si cette association a lieu avec un groupement du site catalytique, il y a inhibition (Sengar, R. S. et al. 2008). Pour toutes ces

raisons la concentration d'EDTA a été augmentée. Suite à l'augmentation de l'EDTA, l'EGTA a tout simplement été enlevé. L'ajustement de la nature et de la concentration des inhibiteurs de protéase utilisés dans le tampon d'extraction a contribué à améliorer la stabilité de l'enzyme. Il est donc fort possible que l'HK ait été dégradée par protéolyse une fois extraite dans le tampon utilisé par Renz et al. (1993).

Tout au long de la purification, il est important pour préserver l'activité enzymatique, de maintenir les enzymes dans un milieu qui se rapproche le plus possible de leur milieu *in vivo*. Par exemple, *in vivo*, la densité moléculaire, dû à la forte concentration en protéines, est important pour permettre le repliement adéquat des protéines, leurs interactions, leur stabilité et le maintien de leur conformation native. L'ajout de certaines composantes dans le tampon d'extraction peut aider à diminuer l'effet d'une diminution de la concentration des protéines suite à l'extraction. L'ajout du glycérol, par exemple, permet de maintenir les interactions protéines-protéines et peut participer à augmenter la stabilité des enzymes. La présence de glycérol en solution forcerait l'interaction de molécules d'eau avec la surface des protéines exposée au solvant (Gekko, K. and Timasheff, S. N. 1981). Un bon maintien de la conformation des protéines permet d'augmenter leur stabilité et de préserver leur activité. L'ajout de KCl joue aussi un rôle favorisant la stabilité des enzymes *in vitro*, en maintenant une force ionique proche de celle qui existe *in vivo* (Kohn, W. D. et al. 1997, Raimbault, C. et al. 1995). Le Triton X-100 est un détergent non ionique utilisé pour solubiliser les protéines membranaires (Li, H. and Roux, S. J. 1992, Neugebauer Judith M 1990, Rasmusson, A. G. and Agius, S. C. 2001). Il pourrait jouer un rôle important pour solubiliser et stabiliser l'activité HK normalement associée aux membranes. Toutes les additions et modifications mentionnées ci-dessus ont été combinées et contribuent à améliorer grandement la stabilité de l'HK extraite à partir des tubercules de pomme de terre. C'est ce milieu d'extraction que nous avons utilisé dans les extractions d'activité HK présentées dans les autres chapitres de ce mémoire.

2.3.2 Analyse par immunodétection

L'analyse par immunodétection des extraits de la fig. 1 conservés au cours du temps montre qu'il y a une dégradation importante d'au moins 2 polypeptides reconnus par les IgG anti-HK au cours du temps suite à l'extraction avec le tampon d'extraction de Renz et al. (1993). Initialement 3 bandes reconnues par les IgG anti-HK, numérotées de 1 à 3, sont visibles suite à l'extraction avec l'un ou l'autre des tampons (figure 2 A et B). Avec le tampon de Renz et al. (1993), l'intensité des 2 bandes de poids moléculaire les plus faibles (bandes 2 et 3) diminue de façon significative après 24h. Après 48h et 72h, la bande 2 continue à diminuer d'intensité tandis que la bande 3 disparaît (figure 2A). En faisant l'extraction avec le tampon d'extraction amélioré, l'intensité des 3 bandes reste la même jusqu'à 72h après l'extraction (figure 2B). Les modifications apportées au tampon d'extraction permettent donc d'augmenter la stabilité des protéines en diminuant leur dégradation.

Figure 2

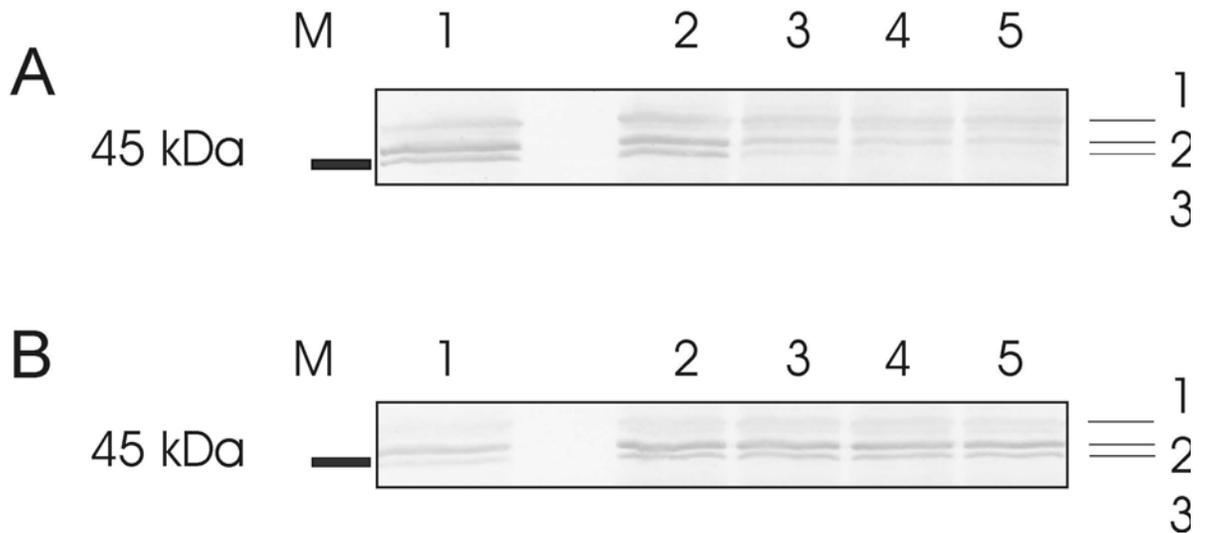


Figure 2 Analyse par immunodétection de la stabilité de l'HK suite à l'utilisation du tampon d'extraction amélioré ou du tampon d'extraction de Renz et al. (1993), et en fonction du temps.

L'HK a été extraite dans les 2 conditions décrites dans la partie matériels et méthodes. Des parties aliquotes des extraits bruts (CE) ont été dénaturées immédiatement après l'extraction ou après 24, 48 et 72 h de stockage à 4°C pour analyse par immunodétection. Une même quantité de protéine a été chargée sur chaque piste. (A) analyse de l'extrait obtenu avec le tampon d'extraction de Renz et al (1993). (B) analyse de l'extrait obtenu avec le tampon amélioré. Les extraits ont été stockés à 4°C pendant 0 h (puits 1), 24 h (puits 2), 48 h (puits 3) et 72 h (puits 4). Les masses moléculaires ont été estimées à partir des marqueurs protéiques suivants: phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa) pour les panneaux A et B, seul le marqueur à 45 kDa est montré. L'anticorps reconnaît 3 bandes, indiquées à droite par des traits et numérotées de 1 à 3.

2.3.3 Profils chromatographiques sur colonne d'interactions hydrophobes

Les extraits générés dans les deux tampons d'extraction ont été analysés par chromatographie sur colonne de Butyl Sépharose. Lors d'essais préliminaires, ce type de séparation, combiné avec le milieu d'extraction amélioré nous avait permis de séparer jusqu'à 4 isoformes d'HK. Suite à l'extraction avec le tampon d'extraction amélioré et à l'élution sur la colonne de Butyl Sepharose, quatre pics d'activité HKs sont bien visibles (Figure 3B). Les pics se retrouvent centrés aux fractions 28 (pic 1), 40 (pic 2), 51 (pic 3) et un quatrième pic plus faible apparaît aux alentours de la fraction 65. Par comparaison, suite à l'extraction avec le tampon d'extraction de Renz et al. (1993) et à la chromatographie sur cette même colonne de Butyl Sepharose, on dénote que la colonne a lié moins d'activité enzymatique (figure 3A). L'activité enzymatique présente dans les pics 1 et 2 apparaît plus faible, tandis que les pics d'activité 3 et 4 sont inexistantes. La modification du tampon d'extraction permet donc dans ce cas-ci de préserver et de séparer quatre pics d'activité plutôt que deux avec le tampon de Renz et al. (1993). De plus, comme les pics d'activité sont plus élevés, il y a plus d'activité pour les étapes subséquentes de purifications. Il apparaît donc que les modifications faites au tampon d'extraction constituent une amélioration importante dans la stratégie de purification. Il est possible que l'apparition de deux nouveaux pics dans le profil B de chromatographie sur Butyl Sépharose soit en grande partie due à l'utilisation de Triton X-100 dans le tampon d'extraction. En effet, en présence de Triton X-100, la quantité de protéines de nature hydrophobe (dont celles qui sont liées aux membranes) devrait logiquement augmenter dans l'extrait. Si certaines HKs sont spécifiquement solubilisées par le traitement au Triton X-100, il est normal d'avoir des pics supplémentaires suite à l'élution de la colonne de Butyl Sépharose. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les pics 3 et 4 qui sont présents dans l'extrait avec le tampon amélioré éluent plus tard que les pics 1 et 2 et sont donc de nature plus fortement hydrophobe.

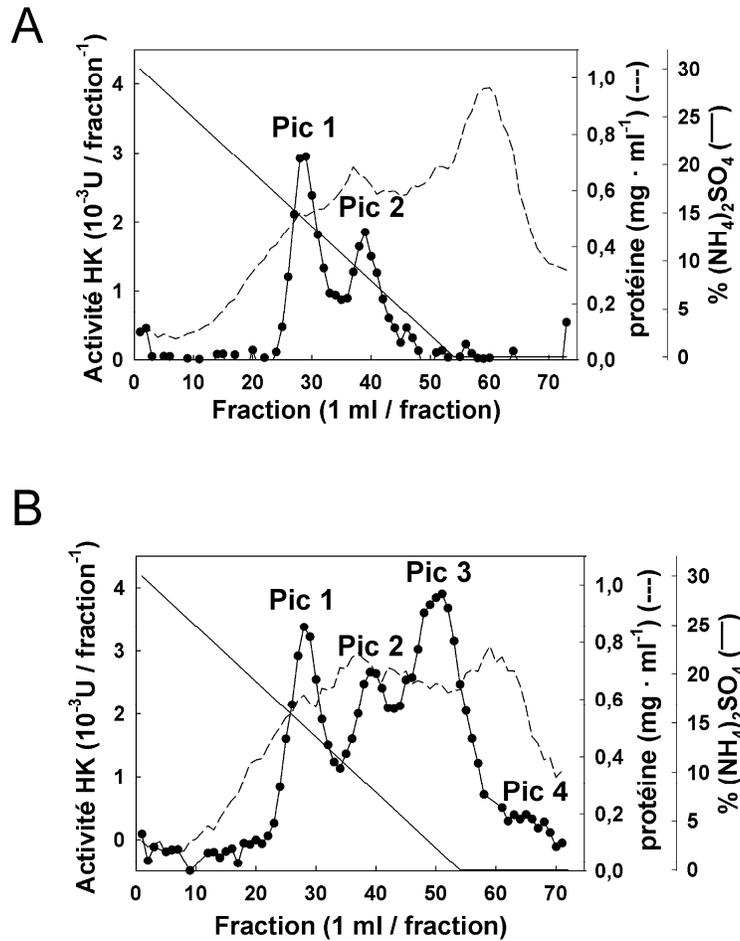


Figure 3 Profils chromatographiques suite à l'utilisation du tampon d'extraction amélioré ou du tampon d'extraction de Renz et al. (1993).

(A) Chromatographie sur colonne de Butyl Sépharose 4 Fast Flow suite à l'utilisation du tampon d'extraction de Renz et al. (1993). Le surnageant 30% (w/v) de sulfate d'ammonium a été appliqué sur une colonne de Butyl Sépharose 4 Fast Flow (1 x 8 cm). Seuls les pics d'activité 1 et 2 sont visibles suite à l'élution. (B) Chromatographie sur colonne de Butyl Sépharose 4 Fast Flow suite à l'utilisation du tampon d'extraction amélioré. Le surnageant 30% (w/v) de sulfate d'ammonium a été appliqué sur la colonne de Butyl Sépharose 4 Fast Flow (1 x 8 cm). La colonne a permis de séparer quatre pics d'activité numérotés 1 à 4 selon leur ordre d'élution.

2.4 Conclusion

En conclusion, la comparaison des données de conservation de l'activité dans le temps, de stabilité des sous-unités HK et des profils d'élution sur colonne de Butyl Sépharose nous indiquent que les modifications apportées au tampon d'extraction sont bénéfiques pour l'HK. Ces conditions d'extraction ont donc été utilisées dans tous les travaux réalisés et présentés dans la suite de ce mémoire.

Chapter 3: Purification, identification and characterization of Hexokinase 1 from potato (*Solanum tuberosum*) tubers

En préparation pour: *The Biochem. Journal*

Auteurs: Moisan, M.-C. et Rivoal, J.

3.1 Abstract

At least 4 HK (hexokinase) isoforms are present in potato tubers and can be separated by hydrophobic interaction chromatography on Butyl Sepharose. One of the most abundant of these isoforms has been further purified using chromatographic separations on Red Dye, DEAE Fractogel, Hydroxyapatite, Cibacron Blue and Mono-Q. The final fraction of the purification was analyzed by SDS/PAGE and contained a single protein band around 48 kDa. This polypeptide cross-reacted with affinity-purified anti-*Solanum chacoense* recombinant HK IgGs. HK specific activity of this fraction (10.2 U/mg protein), corresponds to an enrichment of more than 5000-fold with a yield of 0.9 %. This is the highest reported HK specific activity from a plant source. The purified enzyme was used to determine its kinetic behaviour. The protein was analyzed by MS/MS sequencing and associated with high certainty to the *Solanum tuberosum StHK1* gene.

3.2 Introduction

Glycolysis is the central pathway of metabolism. It supplies carbon to various biosynthetic pathways and feeds mitochondrial respiration, thereby providing energy to the cell in the form of ATP (Plaxton, 1996). Glycolysis in plants is more complex than in other systems

because it is localized in the cytosol and in the plastid. Cytosolic glycolytic enzymes can also be found associated in a metabolon at the surface of the mitochondrion (Giege, P. et al. 2003). The whole pathway is also organized as a network of reactions. This structure implies that alternate enzymes can carry out a particular reaction. Understanding the function of individual enzymes in this pathway is a challenge. This is true in particular for HK (hexokinase) (EC 2.7.1.1). This enzyme catalyzes the phosphorylation of hexoses to generate the corresponding hexose phosphates, which is the first step in the catabolism of free hexoses. HK competes with FK (fructokinase) for available fructose. Entry of carbon in the plant hexose phosphate pool can also occur with the coupled reactions of sucrose synthase (EC 2.4.1.13) and UDP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9). In several systems, HK exerts a high degree of control on the phosphorylation of glucose to glucose 6-phosphate, and plays an important role in the entry of carbon in the glycolytic and pentose phosphate pathways.

In plants, there are two types of HK, according to their subcellular localisation. Type A HKs are soluble in the stroma while type B are anchored to the external membrane of mitochondria or plastids (Olsson, T. et al. 2003). However, recently, the localization of HK on the outer membrane of plastids has been re-evaluated and is now uncertain (Damari-Weissler, H. et al. 2007, Granot, D. 2008). Mitochondria-bound HK is associated with VDAC (voltage-dependent anionic channel) (Balasubramanian, R. et al. 2007), and by providing mitochondria with ADP, this isoform is involved in the antioxidant defence by modulating the electron flux through the respiratory chain which reduces the reactive oxygen species formation (Camacho-Pereira, J. et al. 2009, da-Silva, W. S. et al. 2004, Meyer, L. E. et al. 2006). In addition to its catalytic function, HK also acts as hexose sensor in plants and several other systems (Balasubramanian, R. et al. 2007, Jang, J. C. et al. 1997, Jang, J. C. and Sheen, J. 1994, Moore, B. et al. 2003). In *Arabidopsis thaliana*, HK1, which is a glucose sensor, is thought to be associated with the

mitochondria (Balasubramanian, R. et al. 2007), but it can also be located in the nucleus (Cho, J. I. et al. 2006). Despite its paramount importance in plant primary metabolism, HK has never been purified to homogeneity from a plant tissue. The fact that HK exists as multiple isoforms and is generally present in very small amounts may have been the main problems that have held up progress in that area. Several attempts for the purification of this enzyme from plant tissues have been made in the past, only resulting in partial purification of HK isoforms (Cortes, S. et al. 2003, Dai, N. et al. 2002, Renz, A. et al. 1993, Veramendi, J. et al. 2002, Veramendi, J. et al. 1999). Thus in potato, 3 HK isoforms have previously been separated and partially purified (Renz, A. et al. 1993). However, this study did not provide any information on the identity or the homogeneity of the proteins that were studied. HK purified from potato tubers had higher affinity for glucose and mannose, than with fructose. And some isoform could be inhibited by ADP (Renz, A. and Stitt, M. 1993). The aim of this study was to purify to homogeneity one of the most abundant HK from potato tubers and to characterize its kinetic properties. By using mass spectrometry sequencing, we were able to associate the kinetic properties with a gene product.

3.3 Experimental

3.3.1 Chemicals and Plant material

All chemicals were of analytical grade from Sigma Chemicals (St-Louis, MO, USA), Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada), Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada) or GE Healthcare (Baie D'Urfé, QC, Canada). The water used in all solutions was Milli-Q processed. Potato (*Solanum tuberosum* L. Russet Burbank) tubers used for the purification

were a generous gift from Les Semences Élités du Québec (Pointe aux Outardes, QC, Canada).

3.3.2 Enzyme activity and protein assays

All HK activity assays were conducted according to a protocol modified from Martinez-Barajas, E and Randall, D.D. (1998) by Claeysen, E et al. (2006). HK activity was determined at 30°C using a spectrophotometric coupled enzyme assay in a final volume of 200 µl. The assay medium contained 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 50 mM KCl, 0.3 mM NAD⁺, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM glucose, 5 mM DTT and 1.2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49). The reaction rate was monitored by following NAD⁺ reduction at 340 nm using a VersaMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). FK activity was measured in the above assay buffer except that glucose was replaced by 5 mM fructose and that 8.6 U/ml phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9) was added to the assay medium. For the determination of mannokinase activity, glucose was replaced by 5 mM mannose and the assay medium was supplemented with 8.6 U/ml phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9) and 1.15 U/ml phosphomannose isomerase (EC 5.3.1.8). Galactokinase activity was measured by removing glucose and glucose-6-phosphate dehydrogenase and adding galactose at various concentrations, in a medium containing 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 50 mM KCl, 0.2 mM NADH, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 2 mM phosphoenolpyruvate, 3 U/ml pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) and 0.0025 U/ml lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28). In this case, NADH oxidation was followed at 340 nm. One unit (U) of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the production of 1 µmol of product per min at 30 °C. Protein was quantified using the dye-binding method of Bradford (Bradford, M. M. 1976) with the Bio-Rad protein assay reagent and BSA as a standard.

3.3.3 Buffers used in HK1 purification

The following buffers were used for the purification of potato HK: Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol and 30 % (saturation) (NH₄)₂SO₄. Buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 10% (v/v) glycerol. Buffer C: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol and 1 M KCl. Buffer D: 1 mM sodium phosphate buffer pH 6.8, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 10 % (v/v) glycerol. Buffer E: 180 mM sodium phosphate buffer pH 6.8, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 10 % (v/v) glycerol. Dialysis buffer A: 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol.

3.3.4 Purification of HK1 from potato tuber

All procedures were conducted at 4°C. Potato tubers were rapidly peeled with a Willy Waller and sliced. They were homogenized for 1 min in a Waring blender at maximum speed in an extraction buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10 mM KCl, 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 mM ε-amino-n-caproic-acid, 2 mM PMSF and 2.16 μM leupeptin. The slurry was further homogenized for 1 min with a polytron at maximum setting. The homogenate was then filtered through a Whatman #1 paper. The filtrate was centrifuged 20 min at 4°C and 10 000 g. The supernatant was recovered and brought to 30% (w/v) (NH₄)₂SO₄ by addition of salt with constant stirring. The extract was stirred for 30 min and clarified by centrifugation for 20 min at 4°C and 10 000 g. The supernatant was recovered and loaded onto a Butyl Sepharose 4 Fast Flow column (2.6 x 27 cm) previously equilibrated with buffer A. The column was washed with 3 bed volumes of buffer A at a flow rate of 5 ml/min and eluted with a 900 ml linear gradient of 0 to 100% buffer B in buffer A followed by 300 ml buffer B. Fractions of 15 ml were collected and

assayed. Four activity peaks (designated peaks 1-4, in order of elution) were recovered. The fractions corresponding to activity peak 1 (fractions 26 to 30) were pooled and subjected twice to dialysis against 4 litres of buffer B. The dialysed protein extract was subjected to affinity chromatography on a Reactive Red 120-Agarose column (1 x 8 cm) previously equilibrated with buffer B. The column was washed with 3 bed volumes of buffer B and eluted with a 54 ml linear gradient of 0 to 100% buffer C in buffer B followed by 18 ml buffer C at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions of 1 ml were collected. HK activity eluted in fractions 25 to 37. Fractions were pooled and dialyzed twice in 1 litre buffer B.

Dialysed pooled fractions from the previous step were loaded at a flow rate of 0.5 ml/min on a Fractogel EMD DEAE-650 (S) column (1 x 8 cm), previously equilibrated with buffer B. The column was washed with 3 bed volumes of buffer B and HK activity was eluted with a 50 ml linear gradient of 0 to 50% buffer C in buffer B followed by 16 ml buffer C. Fractions of 1 ml were collected and HK activity eluting from fractions 13 to 16 was collected. The pooled fractions were dialyzed twice against 1 litre dialysis buffer A. The dialyzed fractions were loaded at a flow rate of 0.5 ml/min on a 5 ml bed volume ceramic hydroxyapatite (HAP) Econo-Pac CHT-II Cartridge (Bio-Rad) previously equilibrated with buffer D. The column was washed with 3 bed volumes of buffer D. HK activity was eluted with a 40 ml linear gradient of buffer E in buffer D followed with 16 ml buffer E. Fractions of 1 ml were collected. Fractions from the major activity peak (fractions 40-49) were pooled and dialyzed twice in 1 litre buffer B. Dialyzed fractions were loaded on a GE HealthCare HiTrap Blue HP affinity column, at 0.5 ml/min, previously equilibrated with buffer C. The column was washed with 3 bed volumes of buffer C and eluted with a 40 ml linear gradient of buffer C in buffer B followed with 16 ml buffer C. Fractions of 1 ml were collected. Fractions 24 to 28 were pooled and dialyzed twice against 1 litre of buffer B. The last chromatographic step was conducted using anion exchange on a HR 5/5 Mono-Q column equilibrated with 3 ml buffer B. Pooled dialyzed fractions from the previous step

were loaded at a flow rate of 0.5 ml/min. The column was washed with 3 ml buffer B and HK was eluted with a 10 ml linear gradient of buffer C in buffer B followed with 4 ml buffer C. Fractions of 0.5 ml were collected and HK activity peak was eluted in fractions 8 and 9. Fractions containing purified HK were stored at 4°C and used immediately for characterization.

3.3.5 SDS-PAGE and immunoblot analysis

SDS-PAGE analysis was performed according to Laemmli (1970). Protein samples were denatured for 5 min at 95°C in denaturing buffer (32 % glycerol, 0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 0.0032% (w/v) Bromophenol Blue and 0.1 M DTT). The final acrylamide monomer concentration of the separating gel was 12 % (w/v) and 4.8% (w/v) for the stacking gel. Gels were run at 100 V for 90 min at room temperature. Subunit molecular mass was estimated using the following protein standards (Bio-Rad): phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa). For immunoblot analysis, proteins were transferred to a PVDF membrane for 60 minutes at a constant voltage of 100 V in a transfer buffer containing 0.192M glycine, 0.025M Tris-Base, 20% (v/v) methanol. Immunoblot analysis was carried out with affinity purified anti-HK IgGs (Claeysen, E. et al. 2006) at a 1/50 dilution. Immunodetection was performed as described previously (Claeysen, E. et al. 2006).

3.3.6 Silver nitrate staining in preparation for mass spectrometry analysis

After SDS/PAGE, the acrylamide gel was washed sequentially in a solution containing 50% (v/v) ethanol and 5% (v/v) acetic acid for 60 min followed by a solution containing

50% (v/v) ethanol for 24h. The gel was then rinsed 3 x 10 min with H₂O before a 1 min incubation in 0.02 % (w/v) Na₂S₂O₃. The gel was rinsed 2 x 30 sec in H₂O and incubated for 20 min in 0.1 % (w/v) AgNO₃ at 4°C. It was then washed 2 x 30 sec in H₂O before an incubation of approximately 2 min in a developing solution containing 0.05% (v/v) formaldehyde and 3% (w/v) Na₂CO₃. The gel was fixed in a bath of 5% (v/v) acetic acid for 5 min and washed 3 x 10 min with H₂O. The gel was stored in a 1% (v/v) acetic acid solution. The protein band of interest was excised from the gel for Mass Spectrometry analysis.

3.3.7 Mass spectrometry analysis

Before mass spectrometry analysis (MS), the gel piece was reduced in 10 mM DTT for an hour at 56°C and then treated in 55 mM iodoacetamide for one hour at room temperature. The gel was washed in 50 mM NH₄HCO₃ and shrunk in 100% acetonitrile. The digestion was performed using trypsin in 50 mM NH₄HCO₃ for 4 hours at 37°C. The peptides were extracted in 90% acetonitrile containing 0.5 M urea and dried under vacuum. Samples were solubilized in 5% (v/v) acetonitrile, 0.2% (v/v) formic acid before analysis on a Eksigent nano-LC system coupled to a Thermo LTQ-Orbitrap mass spectrometer with a home-made C₁₈ pre-column (5 mm x 300 µm i.d. Jupiter 3 µm, C₁₈) and an analytical column (10 cm x 150 µm i.d., Jupiter 3 µm C₁₈). Ten µl samples of the tryptic digests were injected on the precolumn at a flow rate of 10 µl/min and subsequently eluted over 56 min onto the analytical column using a 10 to 60% gradient of acetonitrile in 0.2 % (v/v) formic acid at a flow rate of 600 nl/min. Database searches were initially performed using Mascot version 2.1 (Matrix Science, London, UK).

3.3.8 Kinetic analysis

Mono-Q purified HK was used for all kinetic analyses. To study the effect of pH, the Tris-HCl pH 7.5 buffer in the reaction mixture was replaced by a 3 buffers system containing 50 mM acetic acid, 50 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid and 100 mM Tris-Base in order to maintain a constant ionic strength throughout the pH range (Ellis, K. J. and Morrison, J. F. 1982). The reaction mixture was adjusted to various pH values using 1N NaOH or 1N HCl. The assay pH was measured directly in the reaction mixture using a microelectrode immediately after completion of the spectrophotometric assay (Claeyssen, E. et al. 2006). The K_m values were calculated from the Michaelis-Menten equation using a non-linear least-squares regression program (SigmaPlot 8.0, SPSS, Chicago, IL, USA). k_{cat} values were calculated from the V_{max} of Michaelis-Menten plots using a subunit molecular mass of 54 kDa. All the results are the means of three independent enzyme preparations with triplicate assays.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Separation of 4 HK activity peaks and purification of HK1

We introduced the hydrophobic interaction chromatography on butyl sepharose as a first step in our purification scheme because of its high protein binding capacity in addition to the ability to resolve more HK isoform than in previous studies (Renz, A. et al. 1993). Indeed, 4 different HK activity peaks were routinely detected in the chromatographic elution profile of the Butyl Sepharose column (Figure 1a). The 4 peaks were respectively centered on fraction 28 (peak 1), fraction 41 (peak 2), fraction 54 (peak 3) and fraction 70 (peak 4). The conditions described in the experimental section were those giving the best separation between the different peaks. Peaks 1 and 3 always appeared to account for the bulk of extractible HK activity. Peak 4 was always the least abundant activity peak. Activity peak 1 was further purified because it represented one of the major HK isoforms present in potato tubers and it had less cross-contamination from other isoforms. Activity peak 1 was further purified because it represented one of the major HK isoforms present in potato tubers and had less cross contamination from other isoforms. In preliminary trials, it was determined that activity peak 1 could bind strongly to Reactive Red matrix whereas activity peak 2 did not. Therefore, we used affinity chromatography on a Reactive Red column as the second step in the purification process. Pooled and dialyzed fractions from peak 1 were loaded onto a Reactive Red column and HK activity eluted with a KCl gradient. HK activity eluted as a broad peak centered around 0.5 M KCl, showing a shoulder at about 0.3 M KCl (Figure 1b). The main activity peak was separated from the main protein peak. Following this affinity step, pooled fractions were dialyzed and applied onto a DEAE fractogel anion exchange column. HK activity was eluted from the DEAE column using a KCl gradient. HK activity eluted as a sharp peak, centered around 0.15 M

KCl, and displaying a shoulder on the left (Figure 1c). After DEAE Fractogel, pooled and dialyzed HK fractions were loaded onto a HAP column. Proteins were eluted using a Na_2HPO_4 gradient. These conditions resolved two broad peaks of HK activity respectively emerging at 160 mM and 180 mM Na_2HPO_4 (Figure 1d). The peak emerging at the highest ionic strength contained the majority of HK activity. This peak was subjected to 2 other chromatographic steps and proved to be homogenous in terms of HK activity in the 2 subsequent steps. It was therefore named HK1. HAP-purified HK1 was applied on a HiTrap Blue HP affinity column and a single, symmetrical activity peak was eluted at about 0.6 M KCl (Figure 1e). That step allowed completion of the purification of HK1 by removing the remaining contaminant proteins as it is visible on the silver nitrate stained SDS-PAGE (Figure 2). The final step on a Mono-Q anion exchange column allowed concentrating HK1 in 2 fractions of 500 μL eluting at about 0.2 M KCl (Figure 1f). These 2 fractions were used for characterization of HK1. Table 1 summarizes all the results from the various purification steps. The overall procedure gave a purification of more than 5500-fold with a final specific activity of 10.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ using glucose as substrate. This specific activity is more than 10 fold higher than any previously reported HK preparation from a plant tissue.

Figure 1

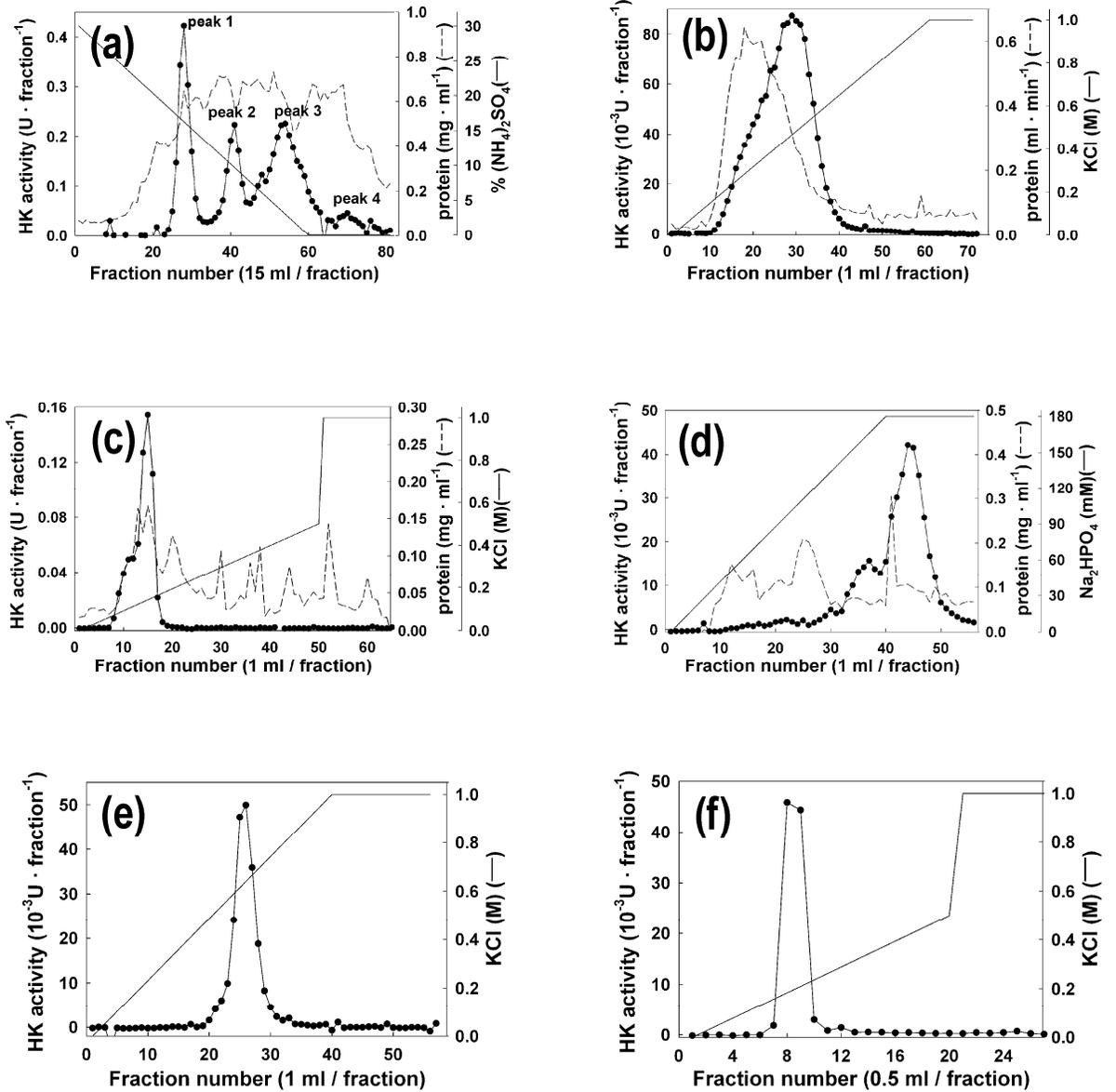


Figure 1 Chromatographic profiles of the different steps of HK1 purification from potato tuber.

(a) Butyl Sepharose 4 Fast Flow chromatography. The clarified 30% (w/v) ammonium sulfate supernatant was applied onto a Butyl sepharose 4 Fast Flow column (2.6 x 27 cm). Four peaks of HK activity numbered 1-4 in order of elution were separated. Peak 1 was further purified; (b) Reactive Red 120-Agarose chromatography; (c) Fractogel EMD DEAE-650 (S) chromatography; (d) Ceramic Hydroxyapatite Econo-Pac CHT-II Cartridge chromatography; (e) HiTrap Blue HP affinity chromatography; (f) Anion exchange HR 5/5 Mono-Q chromatography. For chromatographic steps a-d, the HK activity profile, the protein elution profile and the salt gradient conditions are plotted. For steps (e) and (f) the protein elution profile is not plotted because it was below the detection limit.

Table 1 Purification of HK1 from 400 g of potato tuber

Steps	Total activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Protein (mg)	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	2.091	1142.91	0.0018	1.00	100
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1.819	778.62	0.0023	1.28	87
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	1.506	51.45	0.029	16.00	72
Reactive Red 120-Agarose	0.188	4.01	0.047	25.75	9
Fractogel EMD DEAE-650 (S)	0.129	0.17	0.772	422.03	6.2
Ceramic Hydroxyapatite Econo- Pac CHT-II Cartridge	0.037	0.02	1.817	993.13	1.8
HiTrap Blue HP	0.031	0.012	2.625	1434.70	1.5
Mono Q	0.018	0.002	10.229	5591.22	0.9

3.4.2 Electrophoresis and immunoblot analysis

A sample from each step of the purification step was analysed by SDS/PAGE. The gel was stained with silver nitrate to visualize the purification progress. The final fraction contained a single polypeptide, migrating above the 45 kDa marker. The apparent molecular weight of HK1 was determined to be 48 kDa. The intensity of this band was correlated with HK specific activity during the last steps of the purification. We therefore concluded that this band was likely to correspond to a HK. In order to provide further support to this conclusion, we performed an immunoblot analysis of the various fractions of the purification using anti-HK IgGs that were affinity-purified using recombinant *Solanum chacoense* HK2 (Claeyssen, E. et al. 2006). The migration position of the immunoreactive protein coincided with the position of the only protein band detected with the silver nitrate staining for both Mono-Q fractions.

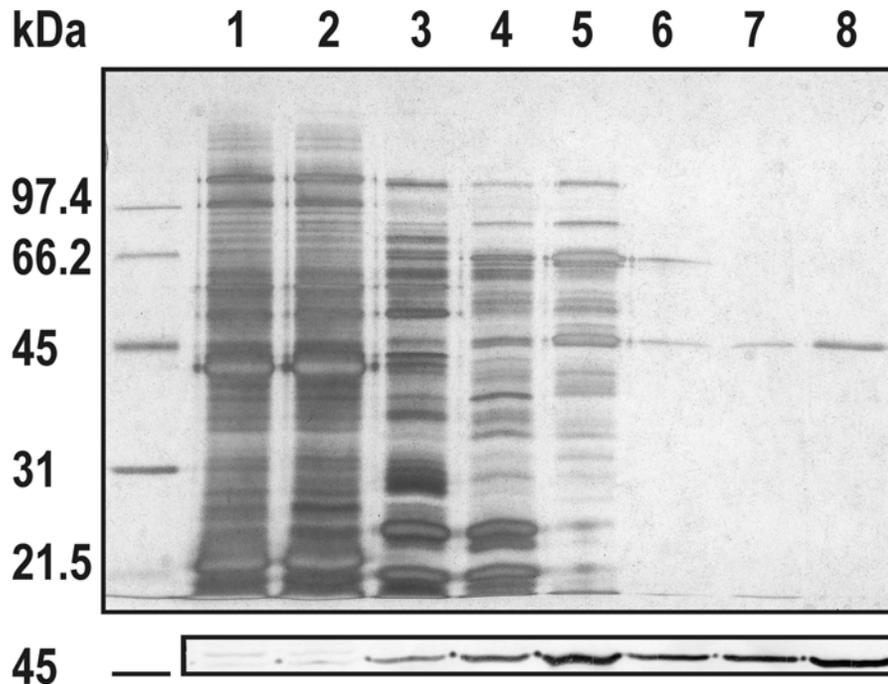


Figure 2 SDS/PAGE and immunoblot analysis of the purification.

(Top panel) Each step of the purification was analysed by SDS/PAGE. The gel was stained with silver nitrate. Lane 1, crude extract (2 μg); lane 2, clarified 30% ammonium sulfate precipitation supernatant (2 μg); lane 3, dialysed pooled fraction of the Butyl Sepharose 4 Fast Flow column (2 μg); lane 4, dialysed pooled fraction of the Reactive Red 120-Agarose column (1 μg); lane 5, dialysed pooled fraction of the Fractogel EMD DEAE-650 (S) column (0.64 μg); lane 6, dialysed pooled fractions of the Ceramic Hydroxyapatite Econo-Pac CHT-II Cartridge column (0.17 μg); lane 7, dialysed pooled fraction of HiTrap Blue HP column (0.14 μg); lane 8, fraction 8 of the Mono-Q column (0.10 μg). (Bottom panel) Immunoblot analysis of a gel loaded as described above was performed using affinity-purified anti-HK IgGs. Subunit molecular mass was estimated using the standard marker proteins phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa) in both panel.

3.4.3 Gene product identification

A sample of the Mono-Q-purified HK1 fraction was subjected SDS/PAGE and silver staining as above. The silver stained band was excised from the gel and subjected to tryptic digestion followed by MS analysis. The tryptic fragments obtained after MS were compared to the protein sequences database using the BLASTp program (Altschul, S. F. et al. 1990). All the peptides obtained by MS analysis matched HK sequences. The best alignment was obtained with SWISSPROT accession number 064390 which corresponded to the product of the *HK1* gene in potato (Veramendi, J. et al. 1999). The overall coverage of the genetic sequence with the tryptic peptides was 43.97% with 12 matching peptides (Figure 3). Alignments with accession number Q9SQ76 (Veramendi, J. et al. 2002) corresponding to *HK2* from the potato gave far less coverage (12.85%) and only 3 matching peptides (data not shown). The purified HK isoform showed high sequence identity in the fragment sequences with the potato *HK1* gene product. We therefore concluded that the purified HK isoform corresponded to the product of potato *HK1* gene. This gene encodes for Swissprot entry HK1_SOLTU (064390), a type B HK isoform (Olsson, 2003). This coding sequence was analyzed with different prediction programs for protein targeting (Table 2).

```

HXK1 matching peptide -----
O64390|HXK1_SOLTU MKKVTVGAAVVGAAAVCAVAALIVNHRMRKSSKWGRAMAILREFEEKCKT

HXK1 matching peptide -----CLSPMSIISQLVMKLGVFYAL
O64390|HXK1_SOLTU QDAKLGQVADAMTVEMHAGLASEGGQSSRCLSPMSIISQLVMKLGVFYAL

HXK1 matching peptide DLGGTNFR-----DGGIIHQEFAEASIPPSLMVGTSDALFDYIAAE
O64390|HXK1_SOLTU DLGGTNFRVLRVQLGGKDGGIIHQEFAEASIPPSLMVGTSDALFDYIAAE

HXK1 matching peptide LAKFVAAEEEEKFHQPPGK-----GFSID
O64390|HXK1_SOLTU LAKFVAAEEEEKFHQPPGKQRELGFHLLIPSNADFNNSTIMRWTKGFSID

HXK1 matching peptide DAVGQDVVGELTK-----VSALVNDTVGTLAGGK----DVAVAVI
O64390|HXK1_SOLTU DAVGQDVVGELTKAMKEKVLDMRVSALVNDTVGTLAGGKYTQKDVAVAVI

HXK1 matching peptide LGTGTNAAYVER-----SGEMVINMEWGNFR-----
O64390|HXK1_SOLTU LGTGTNAAYVERVQAIPKWHGPVPKSGEMVINMEWGNFRS SHLPLTEYDH

HXK1 matching peptide -----MTSGMYLGEILR-----
O64390|HXK1_SOLTU ALDNESLNPAEQIFEKMTSGMYLGEILRRVLTRVAEEVLAFLAMRSLQSL

HXK1 matching peptide -DSFVLRTPDMSAMHHDTPDLK-----LKDILEISNTSLK-----
O64390|HXK1_SOLTU KDSFVLRTPDMSAMHHDTPDLKVVGEKLDILEISNTSLKTRKLVLSLC

HXK1 matching peptide -----TVIAMDGGLYEHYTEY
O64390|HXK1_SOLTU NIVATRGARLDAAGVLGILKKMGRDTPKQGGSERTVIAMDGGLYEHYTEY

HXK1 matching peptide RMCLENSLK-----
O64390|HXK1_SOLTU RMCLENSLKDLLGEELATSI V FVHSNDGSGIGAALLRASHSMYLELQA

```

Figure 3 Amino acid sequence alignment of the tryptic fragments obtained after mass spectrometry analysis and HK1_SOLTU (064390).

The purified protein was subject to tryptic digestion and MS analysis. The sequences obtained were compared by BLAST non redundant protein database. The sequences generated by MS sequencing were aligned using CLUSTAL W with HK1_SOLTU (064390), and covered 57.8% of the length of HK1_SOLTU. Coverage was higher than

with any other HK isoform. The purified protein was identified as HK1_SOLTU, a type B isoform.

Table 2 Subcellular localisation prediction for potato HK1

Prediction program	Subcellular targeting or localisation	Score
Target P 1.1	Secretory pathway	0.711
PSORT 1.1	Endoplasmic reticulum (membrane)	0.820
Protein prowler	Secretory pathway	0.950
Sherloc	Mitochondria	0.86

Swissprot entry HK1_SOLTU (064390) was analyzed with several subcellular targeting prediction programs. They all targeted the gene product preferentially towards the secretory pathway [TargetP (Emanuelsson, O. et al. 2000), PSORT (Nakai, K. and Kanehisa, M. 1991), protein prowler 1.1 (Boden, M. and Hawkins, J. 2005)] or mitochondria [Sherloc (Shatkay, H. et al. 2007)]. SignalP 3.0 (Bendtsen, J. D. et al. 2004) predicted a signal peptide in N-terminal and a cleavage site between amino acid residues 21 and 22. These results are consistent with the identification of HK1_SOLTU as a type B isoform (Olsson, T. et al. 2003) and suggest that the protein is anchored in the endomembrane system by its hydrophobic N-terminus, with the bulk of the protein facing the cytosol (Claeyssen, E. et al. 2006). Even if it is not clear how they specifically reach a particular location, type B isoforms have been reported to either be associated with mitochondria or plastid outer membrane (Olsson, T. et al. 2003), and SignalP 3.0 results suggest that the signal peptide could undergo a cleavage after its transportation. The identity or subcellular localization of the 3 HK isoforms separated from *S. tuberosum* tuber by Renz et al. (1993) was not investigated by the authors. The enzymatic activity for each of these isoforms changed accordingly to the stage of development of tubers. The activity of one isoform being reduced at the expense of another depending on the developmental stage, suggests a different role for each isoform (Renz, A. et al. 1993). Veramendi et al.

(1999) produced StHK1 overexpression and anti-sense transgenic potato plants. Although these modifications affected average tuber number and tuber size, metabolite analyses showed that they did not affect carbohydrate, or metabolite level in tubers. Since HK activity changes with the age of the tubers (Renz, A. et al. 1993) it is possible that the gene expression level modifications did affect the HK differential expression and therefore prevented normal effects of the HK function on the tuber metabolism (Veramendi, J. et al. 2002, Veramendi, J. et al. 1999).

3.4.4 Kinetic analysis of the HK1 isoform

Inhibition by G6P has been reported at 4 mM and 5 mM (Menu, T. et al. 2001, Renz, A. et al. 1993, Veramendi, J. et al. 1999), which are not physiological concentrations in the tubers since the concentrations are between 0.34 and 0.97 mM (Farré, E. M. et al. 2001). It is very unlikely that G6P would inhibit HK activity at a physiological concentration therefore its effect on HK activity was not measured in the present study.

3.4.4.1 Effect of pH

The pH dependence of HK1 was investigated in the physiological range between pH 6.5 and 8.7, and enzyme activity was normalized as a percentage of the activity at the optimal pH of 7.6 (Figure 4). Above optimal pH, HK activity decreased only slightly and more than 80% of activity was retained at pH 8.7. In contrast, activity decreased sharply below pH 7.3 and only 30% activity remained at pH 6.5. HK1 is predicted to operate in the cytosol where pH conditions can vary according to physiological conditions. Our data indicate that HK1 activity is highly sensitive to the pH range often encountered in the cytosol of plant cells. It is therefore quite possible that pH is a major modulator of HK1 activity *in vivo*. For

example, pH drop in the cytosol subsequently to a low oxygen concentration (Roberts, J. K. et al. 1984) could modulate HK1 activity.

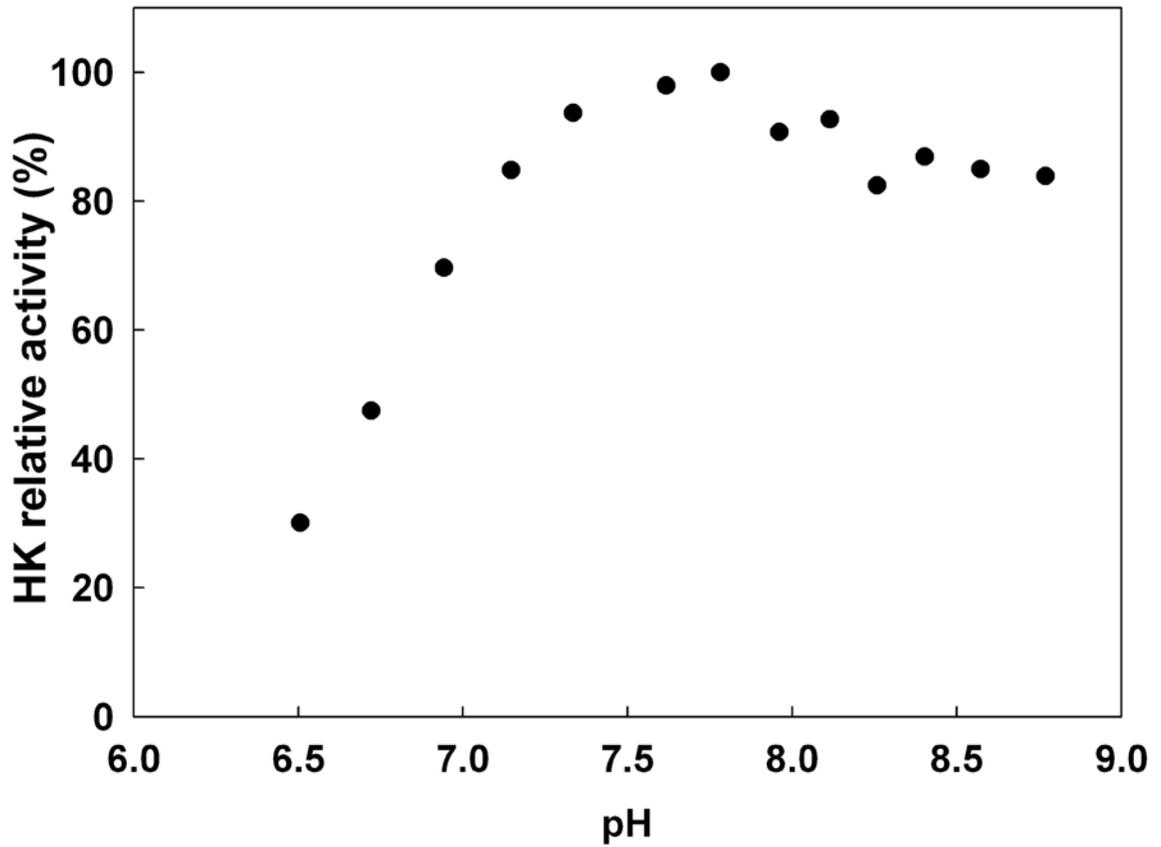


Figure 4 Effect of pH on the activity of HK1 from potato tuber.

The pH dependence of HK1 was measured between pH 6.5 and 8.7. All activity values were normalized as a percentage of the activity at the optimal pH of 7.6.

3.4.4.2 Substrate saturation kinetics with different sugars and nucleoside triphosphates

The affinity of HK1 for glucose ($K_m = 20 \mu\text{M}$) and mannose ($K_m = 18 \mu\text{M}$) were much higher than fructose ($K_m = 9.93 \text{ mM}$) (Table 3). Also, the k_{cat}/K_m value indicates that glucose is the most effective substrate. HK1 could also process galactose, as previously reported in two papers (Miernyk, J. A. and Dennis, D. T. 1983, Turner, J. F. and Copeland, L. 1981), but affinity for this compound was very low (Table 3). Since the glucose concentration in the cell is between 16 mM and 32 mM depending of the cellular compartment (Farré, E. M. et al. 2001), it is unlikely that the HK1 is limited by glucose levels *in vivo*. This is consistent, with the hypothesis that the use of hexose by metabolism is not regulated by the pool of glucose (Renz, A. et al. 1993). ATP and UTP are the major nucleoside triphosphates in the plant cell. They are also two phosphate donors for the reaction catalyzed by HK. We therefore investigated HK1 kinetic behaviour with these 2 substrates. The affinity of HK1 for ATP (0.052 mM) was much higher than for UTP (2.69 mM). A comparison of k_{cat}/K_m values indicates that ATP is the preferred nucleoside triphosphate (Table 3). The affinity for ATP (0.052 mM) appears lower than the reported concentration in the amyloplast and the cytosol (0.2 mM- 0.49 mM) (Farré, E. M. et al. 2001). It could therefore be argued that, under normal conditions, ATP availability would probably not limit HK1 activity. However, this situation could be affected by the subcellular localization. Indeed, HK reaction uses ATP and produces ADP. Chloroplast or mitochondria associated HK isoforms could therefore have better access to ATP generated in these organelles. As reviewed in Neuhaus, H.E. and Emes, M.J. (2000), nonphotosynthetic plastids are poor ATP providers and rather import ATP. Plastids in potato tubers would therefore not act as efficient ATP-generating machinery for HK isoform associated with them. It is also well known that potato tuber mitochondria have poor access to O_2 to support mitochondrial respiration (Geigenberger, P. et al. 2000). It could therefore be hypothesized that if HK1 is indeed attached to the surface of

mitochondria, it could have a premium access to ATP generated by oxidative phosphorylation, which in turn could be tightly controlled by local O₂ concentrations within the tuber.

Table 3 Kinetic parameters of HK1 purified from potato tuber

substrates	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1}/mM)
Glucose	0.02	10.20	9.19	459.28
Mannose	0.018	2.35	2.11	117.47
Fructose	9.93	13.48	12.14	1.22
Galactose	103.13	6.34	5.71	0.055
ATP	0.052	33.13	29.84	573.89
UTP	2.69	29.60	26.67	9.91

3.4.4.3 Inhibition by ADP

The effect of ADP on HK1 activity was tested at concentrations ranging from 0 to 100 μM with various ATP concentrations (0.01 mM, 0.025 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM and 1 mM) (Figure 5).

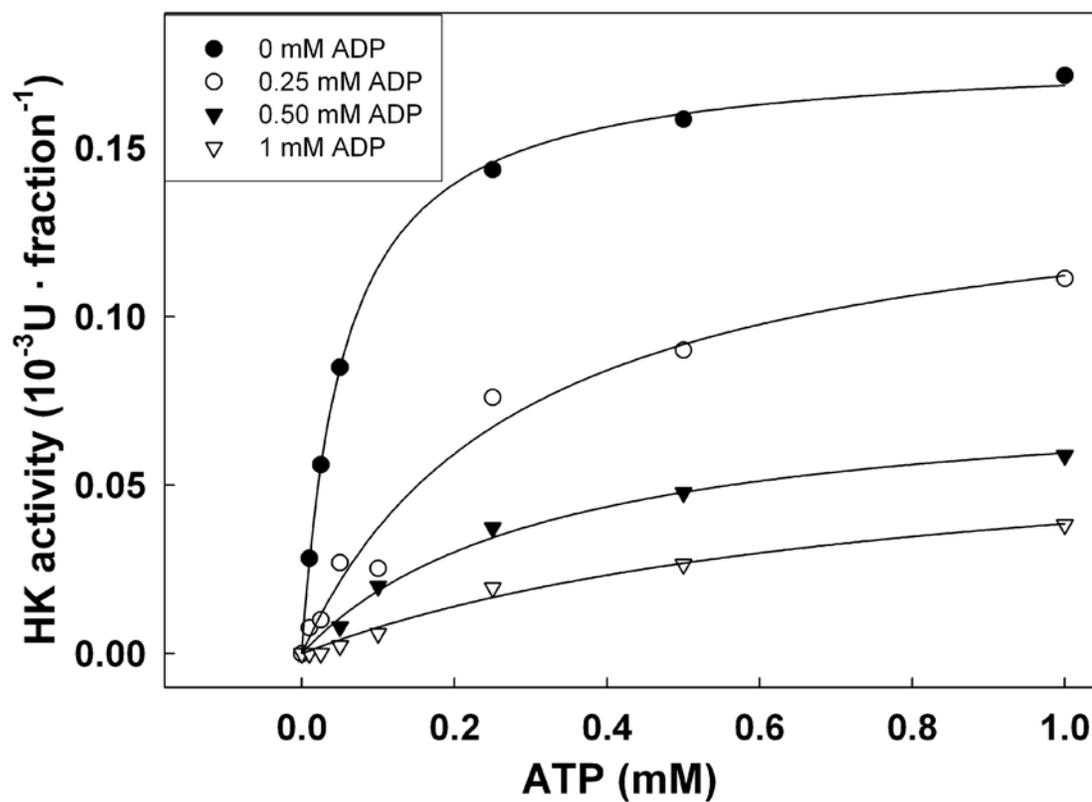


Figure 5 Inhibition by ADP of HK1 from potato tuber.

The direct plots of ATP HK1 saturation kinetics in the presence of varying concentrations of ADP.

HK1 activity was strongly inhibited at very low ADP concentrations. A K_i value of 70 μM was determined from the data. It was proposed that mitochondria associated HK are particularly sensitive to ADP (Galina, A. et al. 1995, Galina, A. et al. 1999), like the HK1 isoform. Binding of HK with mitochondria occurs with porins, using the hydrophobic N-terminus (Balasubramanian, R. et al. 2007). Proximity with mitochondrion would normally provide HK with a direct source of ATP (Yamamoto, Y. T. et al. 2000) and, in return, provides ADP directly to its recycling site, increasing its access for mitochondria respiration (Camacho-Pereira, J. et al. 2009, Galina, A. et al. 1995). ADP concentration is about 21 μM in the cytosol (Farré, E. M. et al. 2001). Since the HK1 K_i for ADP and the cellular concentration of ADP are in the same range, it can be hypothesized that the use of hexoses by HK1 is likely to be modulated by ADP *in vivo*. It is likely that this inhibitory effect would be enhanced by O_2 tensions below 10% since tuber ADP contents have been shown to increase under such limitation in O_2 availability (Geigenberger, P. et al. 2000). It was previously suggested that HK inhibition by ADP was competitive in respect to ATP, so that the ADP/ATP ratio would modulate the HK activity (Renz, A. et al. 1993). However, others have provided data suggesting that inhibition was not competitive (Galina, A. and da Silva, W. S. 2000). The results obtained here suggest a mixed inhibition. Therefore, ADP inhibition would be competitive at low concentration, but would become non-competitive above a certain ATP/ADP ratio. Mitochondria-associated HK isoform is thought to direct its product, G6P, towards carbohydrate polymer synthesis (Galina, A. et al. 1995). Association of HK with mitochondria might be a way to maintain a close relation between glycolysis and ATP recycling system and allow rapid response and control for G6P utilization (Galina, A. and da Silva, W. S. 2000, Graham, J. W. et al. 2007). Inhibition of glucose phosphorylation with ADP could be a way to control the use of G6P depending on prevailing physiological condition. Hence, if this isoform is associated with the mitochondria outer membrane, ADP could modulate its activity, and channel its product towards biosynthetic processes when the conditions are favourable (da-Silva, W. S. et al. 2001, Galina, A. and da Silva, W. S. 2000). Active mitochondrial respiration would prevent

HK inhibition by maintaining a low ADP concentration. While some glycolytic enzymes associate with mitochondria during increases in respiration, HK activity seems to be always associated with this organelle. This association could channel the hexose substrates toward glycolysis and therefore limit competition with other pathways (Graham, J. W. et al. 2007). Although HK1 appears to be one of the most abundant HK isoform in potato tubers, it may not necessarily be very active *in vivo*. It could be partly inhibited at some point during storage. Respiration during storage of potato tuber is maintained at a low level until sprouting. This strategy conserves carbohydrate reserves in the tuber. However, continued low respiration rates during storage cause significant loss of reserves during storage (Wiltshire J.J.J. and Cobb A.H. 1996). Low oxygen tension in potato tubers restricts respiration, leading to a progressive inhibition of glycolysis, and decrease of the ATP/ADP ratio (Geigenberger, P. et al. 2000). Therefore, under those circumstances HK activity could be inhibited or reduced, because of low oxygen leading to a pH drop (Roberts, J. K. et al. 1984) and of the increased ADP concentration.

3.4.5 Mitochondrial hexokinase and ROS production

The continuous association of HK with mitochondria could be part of an important mechanism to prevent or modulate oxidative stress. Indeed, the recycling of ADP with mitochondrial ATP synthase maintains a low mitochondria membrane potential by using the proton gradient which in turn inhibits the formation of reactive oxygen species (ROS) (Camacho-Pereira, J. et al. 2009, da-Silva, W. S. et al. 2004, Meyer, L. E. et al. 2006). ROS are reactive molecules produced by the incomplete reduction of O₂. They are part of the normal operation of aerobic metabolism. The cellular concentration of these molecules must be kept under strict control so that they do not become damaging for the cellular structures (Apel, K. and Hirt, H. 2004). Tuber dormancy breakage is associated with an accumulation of ROS and increasing of metabolic activity like respiration which is a ROS-

producing pathway (Delaplace, P. et al. 2009, Rojas-Beltran, J. A. et al. 2000). HK1 could therefore have a housekeeping function by modulating ROS production in the event of a respiration increase and/or in anticipation of tuber sprouting (Camacho-Pereira, J. et al. 2009).

3.5 Conclusion

In conclusion, a native plant HK was purified to homogeneity for the first time. It corresponds to the gene product of the *HK1* gene from *Solanum tuberosum*, which can be classified as a type B HK. HK1 appears to be one of the most abundant HK isoform present in stored potato tubers. We were able to determine that this endomembrane-associated HK isoform is tightly controlled by pH and ADP concentrations.

3.6 Acknowledgements

This work was supported by a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to J. R. M-C M. was supported in part by a grant from the Fonds de Bourse en Sciences Biologiques of the Université de Montréal. Potato tubers used in this study were a generous gift from Les Semences Élités du Québec, Les Buissons, Qc, Canada.

Chapitre 4: Purification partielle et caractérisation d'une Hexokinase de tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*)

4.1 Introduction

Lors de la séparation de l'activité HK de tubercule de pomme de terre sur butyl sépharose, il a été possible de séparer 4 pics d'activité HK (voir Fig. 1 a, chapitre 1). Le premier pic d'activité (HK1) a été purifié à l'homogénéité suite à une étape de précipitation suivie de six étapes de chromatographie décrites dans le chapitre précédent. Il a ensuite été possible de caractériser les propriétés cinétiques de cette isoforme et de les associer au produit du gène *HK1_SOLTU* (064390). Parallèlement à la purification à homogénéité de l'isoforme HK1 de tubercule de pomme de terre décrite au chapitre 1, nous avons pris avantage du fait que nous pouvions séparer 4 pics d'activité pour chercher à purifier ces différents pics. Nous avons donc évalué les étapes nécessaires à la mise en place d'une stratégie de purification pour les autres isoformes HK séparées par chromatographie sur colonne de Butyl Sépharose. Le troisième pic d'activité apparaissait contenir une quantité importante d'activité HK, même s'il était visiblement contaminé de façon significative par les pics d'activité 2 et 4. Tout comme nous l'avons fait pour la purification de HK1, nous avons étudié l'utilisation des différents types d'interaction à notre disposition pour l'élaboration d'un protocole de purification efficace du pic 3.

Les objectifs de ce travail étaient au départ les même que ceux du chapitre 1, à savoir la purification à l'homogénéité et la caractérisation cinétique et moléculaire de l'isoforme d'HK présente dans le pic 3.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Produits chimiques et matériel végétal

Les tampons, les réactifs et les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique, et proviennent de chez Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, USA), Fisher Scientific (Neapean, ON, Canada) GE Healthcare (Baie D'Urfé, PQ, Canada) ou Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). L'eau utilisée pour préparer les solutions ou pour toute autre utilisation a été purifiée par procédé milli-Q (Millipore Canada, Etobicoke, ON, Canada). Les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) de variété Russet Burbank utilisés dans cette étude proviennent des Semences Élites du Québec (Les Buissons, QC, Canada).

4.2.2 Mesure de l'activité enzymatique et dosage des protéines

L'activité HK a été mesurée à 30°C par spectrophotométrie à l'aide d'enzymes couplés dans un volume final de 200 µl. Le tampon d'essai contenait 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 50 mM KCl, 0.3 mM NAD⁺, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM glucose, 5 mM DTT et 1.2 U/mL glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49). La réaction a été mesurée en suivant la réduction du NAD⁺ à 340 nm à l'aide d'un lecteur de plaque VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Une unité (U) d'activité d'enzymatique correspond à la quantité d'enzyme catalysant la production de 1 µmol de G6P par minute à 30 °C. La quantification des protéines a été réalisée faite en utilisant la méthode de Bradford (Bradford, M. M. 1976) à l'aide du protein assay reagent (Bio-Rad) et de la BSA comme standard.

4.2.3 Tampons utilisés pour la purification HK3

Les tampons suivants ont été utilisés pour la purification : Tampon A : 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycérol et 30 % (saturation) (NH₄)₂SO₄. Tampon B: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT et 10% (v/v) glycérol. Tampon C: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycérol et 1 M KCl. Tampon D: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 10% (v/v) glycérol. Tampon E: 0.75 M sodium phosphate pH 6.8, 10% (v/v) glycérol, 1 mM DTT. Tampon F: 0.02 M sodium phosphate pH 6, 10% (v/v) glycerol, 1 mM DTT. Tampon G: 0.02 M sodium phosphate pH 6, 10% (v/v) glycérol, 1 mM DTT, 1 M KCl.

4.2.4 Purification de l'HK3 des tubercules de pomme de terre

Toutes les étapes de purifications ont été conduites à 4°C. Les tubercules de pommes de terre ont rapidement été pelés et coupés, puis homogénéisés pendant 1 min avec le tampon d'extraction contenant : 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10 mM KCl, 5% (p/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 10% (v/v) glycérol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 mM acide ε-amino-n-caproic, 2 mM phenylmethylsulphonyl (PMSF) et 2.16 μM leupeptine. Ce premier extrait a subi une homogénéisation supplémentaire à 4°C à l'aide d'un homogénéisateur polytron. L'homogénat a ensuite été filtré sous vide sur du papier Whatman numéro 1. Le filtrat a été centrifugé 20 min à 4°C et 10 000 g. Le surnageant a été récupéré et amené à 30% (p/v) (NH₄)₂SO₄ en ajoutant du sel sous agitation constante pendant 30 min. L'extrait a par la suite été centrifugé 20 min 4°C et 10 000 g.

4.2.4.1 Chromatographie par interaction hydrophobe sur Butyl Sepharose 4 Fast Flow

Le surnageant a été chargé sur une colonne de Butyl Sepharose 4 Fast Flow (2.6 x 27 cm) préalablement équilibrée avec le tampon A. La colonne a été lavée avec 3 volumes de colonne de tampon A à la vitesse de $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Les protéines adsorbées sur la matrice ont été éluées grâce à un gradient linéaire de 0 à 100% de tampon B développé sur un volume total de 900 ml. À la suite du gradient, la colonne a été lavée avec 300 ml de tampon B. Des fractions de 15 ml ont été récoltées tout au long de ce processus et leur activité enzymatique mesurée. Les fractions correspondant au troisième pic d'activité (fractions 46 à 61) ont ensuite été regroupées et dialysées 2 fois contre 4 litres de tampon B.

4.2.4.2 Chromatographie d'affinité sur Reactive Red 120-Agarose

L'extrait dialysé a ensuite été soumis à une chromatographie d'affinité sur une colonne de Reactive Red 120-Agarose (1 x 8 cm) préalablement équilibrée avec le tampon B. La colonne a été lavée avec 3 volumes de colonnes de tampon B et éluee avec un gradient linéaire de 54 ml entre 0 et 100% de tampon C suivi par un lavage isocratique avec 18 ml de tampon C à une vitesse de $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Des fractions de 1 ml ont été récoltées, et les fractions contenant de l'activité enzymatique (fractions 40 à 45) ont été rassemblées puis dialysées 2 fois contre 1 L de tampon B.

4.2.4.3 Chromatographie d'échange d'ions sur fractogel EMD DEAE-650 (S)

Les fractions dialysées de l'étape précédente ont par la suite été chargées sur une colonne de fractogel EMD DEAE-650 (S) (1 x 8 cm) préalablement équilibrée avec 3 volumes de tampon B à une vitesse de $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. La colonne a été lavée avec 3 volumes de colonnes

de tampon B et éluée avec un gradient linéaire sur 50 ml de 0 et 50% de tampon C suivi d'un lavage avec 16 ml de tampon C dans des conditions isocratiques. Des fractions de 1 ml ont été récoltées. Les fractions 16 à 19 ont été récupérées puis rassemblées avant d'être dialysées 2 fois contre 1 litre de tampon D.

4.2.4.4 Chromatographie d'échange d'ions sur cellulose phosphate

Les fractions dialysées ont été chargées sur une colonne de cellulose phosphate (1 x 9 cm) préalablement équilibrée avec le tampon D à une vitesse de $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. La colonne a été lavée avec trois volumes de colonne puis éluée avec un gradient linéaire de 54 ml de 0 et 100 % de tampon E suivi par un lavage de la colonne avec 18 ml de tampon E dans des conditions isocratiques. Des fractions de 1 ml ont été récoltées. Les fractions 23 à 34 ont été récupérées et amenées à 30 % (p/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en ajoutant du sel et en mélangeant de manière constante pendant 20 min. L'extrait a ensuite été centrifugé pendant 20 min à 4°C à 10 000 g.

4.2.4.5 Chromatographie d'interaction hydrophobe sur Phenyl Superose HR 5/5

Le surnageant a été chargé à une vitesse de $0.25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ sur une colonne Phenyl Superose HR 5/5 préalablement équilibrée avec 3 volumes de tampon A. L'élution a été faite avec un gradient entre 0 et 100% tampon B sur 10 ml suivi par un lavage de la colonne dans des conditions isocratiques avec 3,5 ml de tampon B. Des fractions de 0,5 ml ont été récoltées. Les fractions 13 à 15 ont été rassemblées avant d'être dialysées 2 fois contre 500 ml de tampon F.

4.2.4.6 Chromatographie d'échange d'ions sur Mono-S HR 5/5

La dernière étape de la chromatographie a été effectuée avec une colonne Mono-S HR 5/5 préalablement équilibrée avec 3 ml de tampon F à une vitesse de 0.5 ml·min⁻¹. Les fractions dialysées de l'étape précédente ont été chargées sur la colonne puis éluées avec un gradient linéaire de 20 ml allant de 0 à 100% de tampon G suivi d'un lavage de la colonne par 6 ml de tampon G dans des conditions isocratiques. Les fractions contenant l'HK partiellement purifiée (fractions 23 à 26) ont été récoltées et entreposées à 4°C.

4.2.5 SDS-PAGE et analyse par immunodétection

Une analyse par SDS-PAGE a été faite suivant le protocole de Laemmli (Laemmli, U. K. 1970). Les échantillons de protéines ont été dénaturés 5 min à 95°C dans un tampon dénaturant [32% (v/v) glycérol, 0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 8% (p/v) SDS, 0.0032% (p/v) de bleu de bromophénol et 0.1 M DTT]. Les concentrations finales de monomère d'acrylamide étaient de 12% (p/v) pour le gel de séparation et de 4.8% (p/v) pour le gel d'empilement. La migration des gels a été faite pendant 90 min à 100 V à la température de la pièce. Les poids moléculaires ont été estimés à l'aide d'une échelle standard (Bio-Rad) : phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa) et lysozyme (14.4 kDa). Les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF pendant 60 min avec un voltage constant de 100 V dans un tampon de transfert contenant 0.192 M glycine, 0.025 M Tris-base et 20% (v/v) méthanol. L'analyse par immunodétection a été faite à l'aide des IgGs anti-HK purifiées par affinité (Claeyssen, E. et al. 2006) et diluées 1/50. L'immunodétection a été effectuée comme décrit précédemment (Claeyssen, E. et al. 2006).

4.2.6 Coloration au nitrate d'argent et préparation pour l'analyse par spectrométrie de masse

Suite à l'analyse par SDS-PAGE, le gel d'acrylamide a été lavé de façon séquentielle dans une solution contenant 50 % (v/v) d'éthanol et 5% (v/v) acide acétique pendant 60 min, puis 24 h dans 50% (v/v) d'éthanol. Le gel a par la suite été rincé 3 x 10 min avec H₂O avant d'être incubé 1 min dans une solution de 0.02 % (p/v) Na₂S₂O₃. Le gel a par la suite été lavé 2 x 30 sec dans H₂O puis incubé pendant 20 min dans une solution de 0.1 % (p/v) AgNO₃ à 4°C. Le gel a été lavé 2 x 30 sec dans H₂O avant d'être incubé dans la solution de révélation contenant 0.05 % (v/v) formaldéhyde et 3 % (p/v) Na₂CO₃ jusqu'à ce que les protéines soient visibles sur le gel (environ 2 min). La coloration a été fixée à l'aide d'un bain de 5 % (v/v) d'acide acétique pendant 5 min. Suite à la fixation, le gel a été lavé dans du H₂O 3 x 10 min puis entreposé dans une solution 1 % (v/v) d'acide acétique. La bande de protéine correspondant au poids moléculaire de l'HK a été excisée du gel.

4.2.7 Analyse par spectrométrie de masse

Avant l'analyse par spectrométrie de masse (MS) la protéine présente dans la bande de gel excisée a été réduite dans une solution de 10 mM DTT pendant une heure à 56°C puis soumise à un traitement alcalin dans 55 mM d'iodoacétamide pendant une heure à température pièce. Le gel a ensuite été lavé dans 55 mM de bicarbonate d'ammonium puis dans 100% d'acétonitrile. La digestion de la protéine par la trypsine a duré 4 heures à 37°C dans une solution de 50 mM de bicarbonate d'ammonium. L'extraction des peptides s'est faite dans une solution de 90% (v/v) d'acétonitrile et 0.5 M urée. L'extrait a ensuite été évaporé à sec. Les échantillons ont ensuite été solubilisés dans une solution de 5 % (v/v) d'acétonitrile et 0.2% (v/v) HCOOH avant d'être analysés avec un système nano-LC

Eksigent couplé avec un spectromètre de masse Thermo LTQ-Orbitrap. La séparation des peptides a été faite par chromatographie en phase inversée à l'aide d'une pré-colonne C₁₈ coulée manuellement (5 mm x 300 µm, Jupiter 3 µm, C₁₈) couplée à une colonne analytique (10 cm x 150 µm, Jupiter 3 µm C₁₈). Le volume de l'échantillon était de 10 µl. La digestion tryptique a d'abord été chargée sur la pré-colonne à une vitesse de 10 µl/min puis élue sur la colonne analytique en suivant un gradient de 10 à 60% (v/v) d'une solution aqueuse d'acétonitrile 0,2 % (v/v) HCOOH pendant 56 min à 600 nl/min. L'analyse et la recherche de bases de données ont été faites initialement en utilisant le logiciel Mascot version 2.1 de (Matrix Science, London, UK).

4.2.8 Analyse des propriétés cinétiques

Les fractions partiellement purifiées ont été utilisées pour faire des analyses cinétiques préliminaires avec le glucose. Étant donné l'impossibilité de doser les protéines il n'a pas été possible de calculer le V_{\max} , le k_{cat} ainsi que le k_{cat} / K_m selon l'équation de Michaelis-Menten. Les valeurs de K_m et V_{\max} sont des données brutes obtenues avec le logiciel Sigma Plot 8.0.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Séparation de 4 pics d'activité HK et purification partielle de l'HK3

Quatre pics d'activité HK ont été identifiés suite à l'élution de la colonne de Butyl Sepharose (Figure 1A). Les trois premiers pics sont respectivement centrés autour des

fractions 25 (pic 1), 40 (pic 2), 53 (pic 3). Un quatrième pic assez large et peu marqué est détectable aux alentours de la fraction 68. Ce profil est comparable à celui de la Figure 1a du chapitre 3. Lors des éluions de la colonne Butyl Sepharose les pics 1 et 3 étaient à chaque fois les plus proéminents. Selon les expériences, le pic 2 se retrouvait parfois dissimulé entre les pics 1 et 3. Le pic 4 était quant à lui toujours le plus faible. Dans ce cas-ci, le pic 3 présentait l'activité HK la plus élevée. Après avoir purifié le pic 1 (chapitre 3), la purification du pic 3 semblait être la suite logique. Tout comme pour le pic 1, l'activité du pic 3 se lie aussi à la résine Reactive Red. Il a été déterminé dans des essais préliminaires que le pic 2 ne se lie pas à cette résine, cette étape permet donc d'éliminer l'activité du pic 2 qui aurait pu être récoltée en même temps que le pic 3. Les fractions dialysées du pic 3 ont été chargées sur la colonne Reactive Red puis éluées avec un gradient de KCl. L'activité HK interagit fortement avec cette matrice d'affinité car elle éluée aux alentours d'une concentration de 0,75 M KCl. L'utilisation de cette colonne comme deuxième étape de chromatographie permet de concentrer l'activité HK (Figure 2) et d'éliminer les protéines faiblement liées à la matrice qui éluent au début de l'éluion (Figure 1B). Cependant, un pic important de protéines est élué au même endroit que l'activité HK.

Figure 1

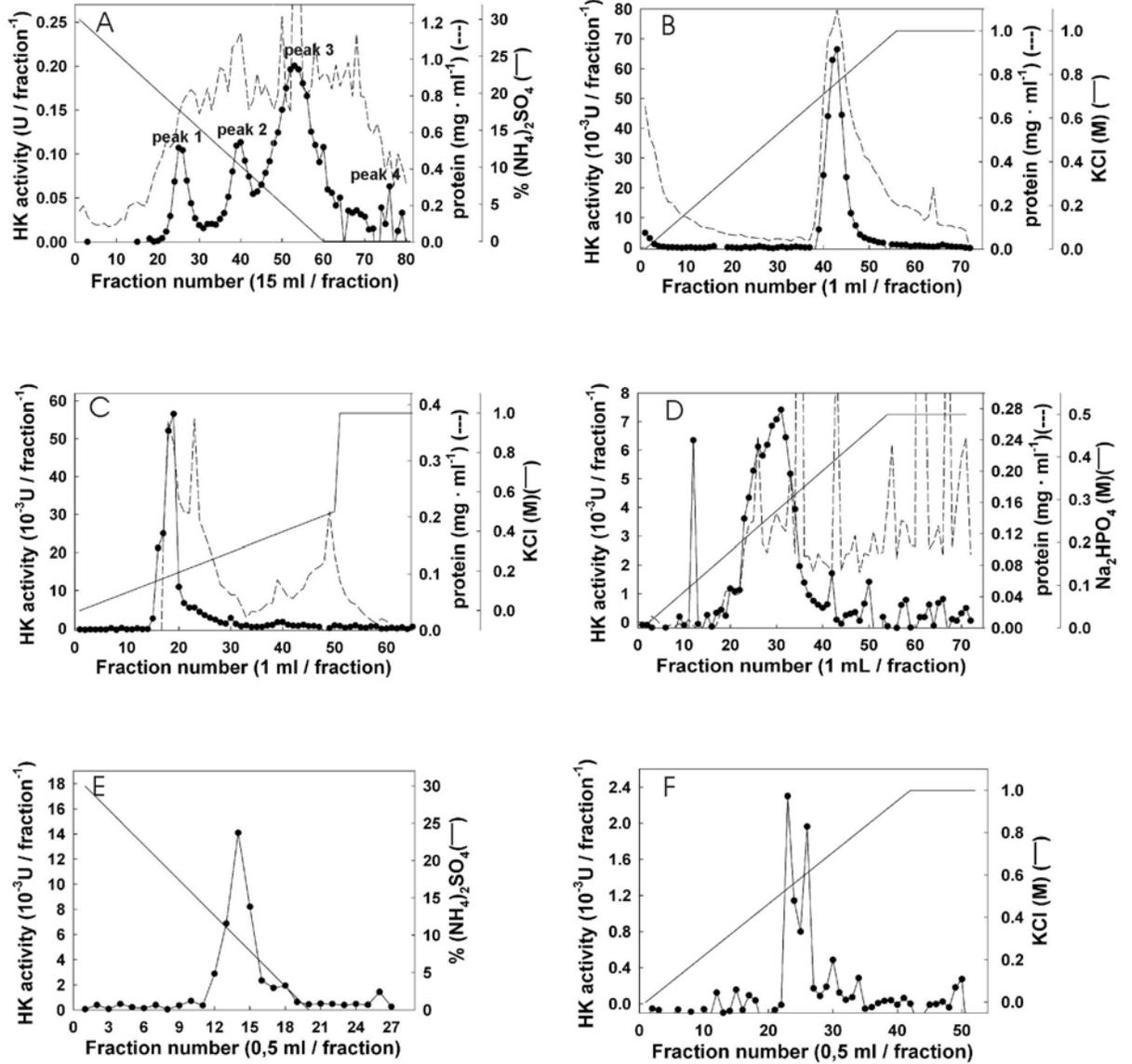


Figure 1 Profils chromatographiques des différentes étapes de la purification partielle de HK3 à partir de tubercule de pommes de terre.

(A) Chromatographie sur colonne de Butyl Sépharose 4 Fast Flow. Le surnageant 30% (p/v) de sulfate d'ammonium a été appliqué sur la colonne de Butyl Sépharose 4 Fast Flow (2.6 x 27 cm). La colonne a permis de séparer 4 pics d'activité numérotés 1 à 4 selon leur ordre d'élution. La purification du pic 3 a été poursuivie. (B) Chromatographie sur colonne de Reactive Red 120-Agarose. (C) Chromatographie sur colonne de Fractogel EMD DEAE-650 (S). (D) Chromatographie sur colonne de cellulose phosphate (1 x 8 cm) (E) Chromatographie sur colonne HR 5/5 Phényl Superose. (F) Chromatographie sur colonne échangeuse de cations HR 5/5 mono-S. Pour les chromatogrammes de A à D, le profil d'élution des protéines, de l'activité HK testée avec le glucose comme substrat et le gradient utilisé pour l'élution sont représentés. Le profil d'élution des protéines n'est pas représenté dans les graphiques E et F, car les valeurs se trouvaient sous le seuil limite de détection.

Suite à cette étape de chromatographie d'affinité, les fractions regroupées et dialysées du pic d'activité HK ont été chargées sur une colonne échangeuse d'anions DEAE fractogel. Un gradient de KCl a permis d'éluer l'activité HK, avec un épaulement sur la gauche, aux alentours de 0,20 M KCl (Figure 1C). Les fractions contenant de l'activité HK obtenues suite à cette étape de chromatographie ont par la suite été regroupées, dialysées puis chargées sur une colonne de cellulose phosphate et l'activité a été éluee avec un gradient de Na_2HPO_4 . L'élution a ainsi permis d'éluer un pic d'activité HK aux alentours de 0.3 M Na_2HPO_4 (Figure 1D). Les fractions contenant de l'activité HK ont par la suite été amenées à 30 % (p/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, puis, après une centrifugation, le surnageant a été chargé sur une colonne de Phenyl Superose. L'activité HK est éluee à dans un tampon contenant environ 9 % (p/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Après cette étape, cette isoforme a été désignée HK3 (Figure 1E). La dernière étape de purification avec une colonne échangeuse de cations Mono-S a permis d'éluer l'activité HK dans 4 fractions de 0.5 ml (fractions 23 à 26) à environ 0.55 M KCl (Figure 1F). Les fractions 25 et 26 ont été utilisées pour caractériser l'activité HK de cette isoforme en utilisant le glucose comme substrat et pour obtenir des données de séquençage pour la protéine purifiée (voir plus bas). Il n'a pas été possible de pousser plus loin la purification ni la caractérisation, étant donné que les quantités d'activité HK purifiées après l'étape de chromatographie sur Mono-S étaient insuffisantes. Pour la même raison, il n'a pas été possible de doser les protéines sur la fraction HK la plus purifiée, et donc de faire un tableau de purification et mesurer l'activité spécifique finale.

4.3.2 Analyse par électrophorèse et immunodétection

Un échantillon de chaque étape de la purification a été analysé par SDS-PAGE. Le gel a été coloré au nitrate d'argent. Bien que HK3 ne soit pas purifiée à l'homogénéité, la complexité protéique est de beaucoup diminuée suite la purification partielle (Figure 2A). Une

immunodétection a aussi été faite sur ces mêmes fractions en utilisant des IgGs anti-HK purifiés par affinité à l'aide de l'HK2 recombinante de *Solanum chacoense* (Claeyssen, E. et al. 2006). Un polypeptide correspondant à la protéine reconnue par l'anticorps est visible (indiqué par une flèche) sur le gel coloré au nitrate d'argent légèrement au-dessus du marqueur de 45 kDa (figure 2B) il pourrait s'agir de HK3.

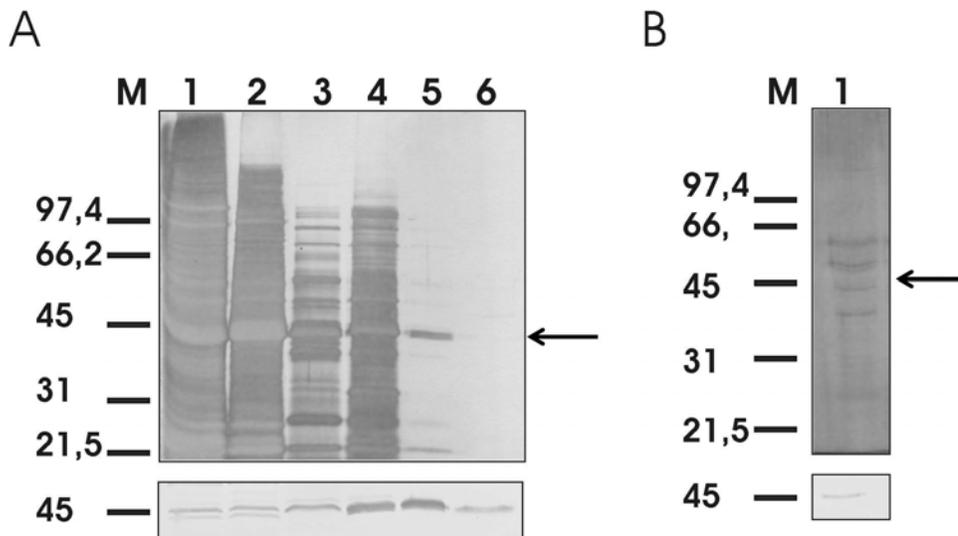


Figure 2 Analyse par SDS-PAGE et immunodétection de la purification partielle

Chaque étape de la purification partielle a été analysée par SDS-PAGE. Le gel a été coloré au nitrate d'argent. (A) (Panneau supérieur) Puits 1, extrait brut; puits 2, surnageant de la centrifugation après la précipitation au sulfate d'ammonium 30% : puits 3, fractions dialysées suite à la chromatographie sur la colonne de Butyl Sepharose 4 Fast Flow; puits 4, fractions dialysées suite à la chromatographie sur la colonne de Reactive Red 120-Agarose; puits 5, fractions dialysées suite à la chromatographie sur la colonne de Fractogel EMD DEAE-650 (S); puits 6, fractions dialysées suite à la chromatographie sur la colonne de cellulose phosphate (une bande de faible intensité est visible vis-à-vis du tiret noir); (Panneau inférieur) Analyse par immunodétection à l'aide d'un anticorps anti-HK IgGs purifié par affinité des fractions décrites dans le panneau supérieur. (B) (Panneau supérieur) Puits 1, fraction 25 de la chromatographie sur la colonne échangeuse de cations HR 5/5 mono-S. (Panneau inférieur) Analyse par immunodétection de la fraction décrit dans le panneau supérieur, fait à l'aide d'un anticorps anti-HK IgGs purifié par affinité. Les masses moléculaires ont été estimées à partir des marqueurs standards, protéines phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa) pour les panneaux A et B.

4.3.3 Séquençage par MS du polypeptide HK3 purifié

La protéine identifiée précédemment par les IgG anti HK a été soumise à une digestion tryptique et à une analyse par MS. Les résultats obtenus ont été comparés à la banque de données de protéines non-redondante de Blast. Les séquences et le 'protein score' obtenus indiquent qu'il s'agit bien d'une isoforme HK (résultats non présentés). Par contre, étant donné que la quantité de protéine soumise à l'analyse était faible, nous n'avons pas pu identifier clairement le gène correspondant aux séquences peptidiques. On retrouve dans HK3 des peptides tryptiques correspondant à HK1 (064390) et HK2(Q9SQ76). Les pourcentages de couverture des produits de gène HK de pomme de terre présents dans les bases de données sont de 35% pour HK1_SOLTU (064390) et de 24 % pour HK2_SOLTU (Q9SQ76) (tableau 1) ce qui est faible et ne permet pas de tirer de conclusion définitive. Il est également probable selon les résultats obtenus que le polypeptide séquencé contienne encore un mélange de plusieurs HK à ce stade de purification. Les séquences générées par le MS ne permettent donc pas d'identifier avec certitude le gène HK correspondant au polypeptide présent dans le pic d'activité HK3. Pour le moment, seulement trois isoformes d'HK ont été isolés chez la pomme de terre, mais il se pourrait qu'il en compte d'avantage comme c'est le cas pour le génome d'*A. thaliana*, qui en compte six (Claeyssen, E. and Rivoal, J. 2007, Karve, A. et al. 2008, Rolland, F. et al. 2002), celui de la tomate (*L. Esculentum*) quatre (Kandel-Kfir, M. et al. 2006) et celui du riz (*O. sativa L.*) dix (Cho, J. I. et al. 2006). Le génome de la pomme de terre étant encore incomplet, il se pourrait donc que le gène correspondant à HK3 ne soit pas encore identifié.

4.3.4 Données préliminaires de cinétique de saturation de HK3 par le glucose

La quantité de HK3 étant très faible suite à la purification partielle, seulement deux courbes de saturation avec le glucose ont été faites. Les K_m obtenus pour chaque courbe sont 0,024 et 0,012 mM, et de 104,5 et 28 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pour les V_{max} (Tableau 2). Il s'agit dans les deux

cas de valeurs qui sont dans le même ordre de grandeur que celles obtenues avec HK1, soit un K_m de 0,02 mM et un V_{max} de 90 $\mu\text{mol}/\text{min}$. On peut donc conclure que l'isoforme purifiée a une très forte affinité pour le glucose, une caractéristique des HKs végétales déjà discutée pour l'isoforme HK1. La purification étant partielle il s'agit de données préliminaires, il n'est donc pas possible de discuter plus en détails du rôle potentiel de cette isoforme en fonction de ces propriétés cinétiques.

Tableau 1 Séquences générées par le MS identiques aux produits de deux gènes de *S. tuberosum*

Séquences peptidiques obtenues par MS Identiques à HK1_SOLTU (064390) (35 % de couverture)		Séquences peptidiques obtenues par MS identiques à HK2_SOLTU (Q9SQ76) (23 % de couverture)	
SSKWGR	aa 31 à 36	LKQVADAMTVEMHAGLASEGGSK	aa 55 à 77
AMAILREFEEK	aa 37 à 47	FVAEEGEEFHPPPGR	aa 154 à 168
FVAEEEEKFHQPPGK	aa 154 à 168	GFSIDDTVGGKDVVAELTK	aa 196 à 213
WTKGFSIDDAVGQDVVGELTK	aa 193 à 213	VSALVNDTVGTLAGGR	aa 224 à 239
GFSIDDAVGQDVVGELTK	aa 196 à 213	SGEMVINMEWGNFR	aa 276 à 289
VSALVNDTVGTLAGGK	aa 224 à 239	NSFILR	aa 351 à 357
VSALVNDTVGTLAGGKYTQK	aa 224 à 243	DILEISNSSLKTR	aa 380 à 392
YTQKDVAVAVILGTGTNAAYVER	aa 240 à 262	LAAAGILGIIKK	aa 409 à 420
DVAVAVILGTGTNAAYVER	aa 244 à 262		
WHGPVPK	aa 278 à 275		
VQAIPKWHGPVPK	aa 263 à 275		
SGEMVINMEWGNFR	aa 275 à 289		
LKDILEISNTSLK	aa 279 à 291		
DILEISNTSLK	aa 281 à 291		
MTSGMYLGEILR	aa 317 à 328		
DSFVLR	aa 352 à 357		
MGRDTPK	aa 422 à 428		
TVIAMDGGLYEHYTEYR	aa 435 à 451		

Tableau 2 Constantes catalytiques avec le glucose de HK3 de tubercules de pomme de terre

Substrat (Glucose)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Essai 1	0,024	104,5
Essai 2	0,012	28,0

4.4 Conclusion

Pour le moment les résultats pour la purification de HK3 sont encore très préliminaires. Les résultats de séquençage par MS et la reconnaissance de HK3 par les IgG anti-HK permettent d'affirmer que la protéine purifiée est bien une HK. Par contre, ces données limitées ne permettent pas d'identifier le gène qui correspond à cette protéine. Éventuellement, il sera intéressant de refaire la purification et le séquençage par MS une fois que le génome de la pomme de terre sera séquencé. En connaissant la séquence d'acides aminés de HK3, l'analyse avec différents logiciels de prédiction permettra de donner une idée de sa localisation cellulaire probable, ce qui, couplé avec des propriétés cinétiques peut permettre de discuter des rôles probable de cette isoforme. Il reste donc à purifier à homogénéité en quantité suffisante HK3 pour pouvoir analyser ses propriétés cinétiques et éventuellement l'associer à un produit de gène.

Conclusion

La caractérisation des propriétés biochimiques des enzymes étant une façon de mieux comprendre les voies métaboliques, mon projet consistait à purifier et caractériser les propriétés cinétiques d'une HK. Cette enzyme, première enzyme de la voie de la glycolyse, permet l'entrée des hexoses dans le pool des hexoses phosphate.

Dans le présent travail, au chapitre 2, certaines modifications apportées au tampon d'extraction déjà existant de Renz et al. (1993), ont permis d'augmenter le rendement de la purification en diminuant la dégradation de l'HK. L'utilisation de ce tampon d'extraction a permis d'optimiser cette étape en diminuant les pertes d'HK, et la première étape de chromatographie sur colonne de butyl sépharose permet désormais la séparation de 4 isoformes, soit une de plus que Renz et al. (1993).

Dans le chapitre 3, la purification à homogénéité de l'HK végétale a permis grâce au séquençage d'associer cette isoforme (HK1) et ses propriétés cinétiques à un produit de gène [HK1_SOLTU (064390)], chose qui n'avait jamais été fait auparavant. En utilisant certains logiciels d'analyse, il a aussi été possible d'obtenir certaines informations sur sa localisation et ainsi émettre des hypothèses sur son rôle et son fonctionnement au niveau cellulaire. Ainsi, HK1 serait associée aux mitochondries et serait impliquée dans un mécanisme de prévention du stress oxydatif. Cette isoforme associée aux mitochondries fournirait l'ADP à l'ATP synthase. De cette façon, le recyclage rapide de l'ADP permettrait, en utilisant le gradient de protons, de maintenir le potentiel de membrane faible et par le fait même permettrait de réduire la formation de ROS qui sont dommageables pour la cellule.

Pour le moment, bien que les résultats pour la purification de la deuxième isoforme (HK3) soient partiels il a quand même été possible d'affirmer qu'il s'agit d'une HK.

Éventuellement, lorsque le génome de la pomme de terre sera séquencé il sera intéressant de savoir combien d'isoformes se trouvent réellement dans le tubercule de *S. tuberosum*. D'ici là, la purification et la caractérisation éventuelle de l'HK3 pourra aussi donner de l'information sur le rôle et le fonctionnement de cette isoforme. Les connaissances sur sa localisation ainsi que ses propriétés cinétiques pourront nous orienter pour déterminer si elle a un rôle similaire ou différent de l'HK1.

Bibliographie

Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., and Lipman,D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410.

Apel,K. and Hirt,H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu.Rev.Plant Biol.* 55:373-399.

Arzoine,L., Zilberberg,N., Ben-Romano,R., and Shoshan-Barmatz,V. (2009) Voltage-dependent anion channel-1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity. *J.Biol.Chem.* 284:3946-3955.

**Azoulay-Zohar,H., Israelson,A., bu-Hamad,S., and Shoshan-Barmatz,V. (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death
2. *Biochem.J.* 377:347-355.**

Balasubramanian,R., Karve,A., Kandasamy,M., Meagher,R.B., and Moore,B.D. (2007) A Role for F-Actin in Hexokinase Mediated Glucose Signaling. *Plant Physiol* 145:1423-1434.

Beevers,H. and Gibbs,M. (1954) Position of C in Alcohol and Carbon Dioxide Formed from Labeled Glucose by Corn Root Tips. *Plant Physiol* 29:318-321.

Bendtsen,J.D., Nielsen,H., von,H.G., and Brunak,S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J.Mol.Biol.* 340:783-795.

Bernardo,S.M., Gray,K.A., Todd,R.B., Cheetham,B.F., and Katz,M.E. (2007) Characterization of regulatory non-catalytic hexokinases in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Genet.Genomics* 277:519-532.

Boden,M. and Hawkins,J. (2005) Prediction of subcellular localization using sequence-biased recurrent networks. *Bioinformatics* 21:2279-2286.

- Bohmert,K., Balbo,I., Steinbuchel,A., Tischendorf,G., and Willmitzer,L. (2002)** Constitutive expression of the beta-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. *Plant Physiol* 128:1282-1290.
- Bouny,J.M. and Saglio,P.H. (1996)** Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pretreatment. *Plant Physiol* 111:187-194.
- Bradford,M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.
- Camacho-Pereira,J., Meyer,L.E., Machado,L.B., Oliveira,M.F., and Galina,A. (2009)** Reactive oxygen species production by potato tuber mitochondria modulated by mitochondrially bound hexokinase activity. *Plant Physiol* 149:1099-1110.
- Cardenas,M.L. (1997)** Kinetic behaviour of vertebrate hexokinases with emphasis on hexokinase D (IV). *Biochem.Soc.Trans.* 25:131-135.
- Cardenas,M.L., Cornish-Bowden,A., and Ureta,T. (1998)** Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim.Biophys.Acta* 1401:242-264.
- Cho,J.I., Ryoo,N., Eom,J.S., Lee,D.W., Kim,H.B., Jeong,S.W., Lee,Y.H., Kwon,Y.K., Cho,M.H., Bhoo,S.H., Hahn,T.R., Park,Y.I., Hwang,I., Sheen,J., and Jeon,J.S. (2009)** Role of the Rice Hexokinases OsHXX5 and OsHXX6 as Glucose Sensors. *Plant Physiol* 149:745-759.
- Cho,J.I., Ryoo,N., Ko,S., Lee,S.K., Lee,J., Jung,K.H., Lee,Y.H., Bhoo,S.H., Winderickx,J., An,G., Hahn,T.R., and Jeon,J.S. (2006)** Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 224:598-611.
- Cho,Y.H., Yoo,S.D., and Sheen,J. (2006)** Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* 127:579-589.
- Claeyssen,E. and Rivoal,J. (2007)** Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *phytochemistry* 68:709-731.

Clayssens,E., Wally,O., Matton,D.P., Morse,D., and Rivoal,J. (2006) Cloning, expression, purification, and properties of a putative plasma membrane hexokinase from *Solanum chacoense*. *Protein Expr.Purif.* 47:329-339.

Cortes,S., Gromova,M., Evrard,A., Roby,C., Heyraud,A., Rolin,D.B., Raymond,P., and Brouquisse,R.M. (2003) In plants, 3-o-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol* 131:824-837.

Crowley,V., Gennidakis,S., and Plaxton,W.C. (2005) In vitro proteolysis of phosphoenolpyruvate carboxylase from developing castor oil seeds by an endogenous thiol endopeptidase. *Plant Cell Physiol* 46:1855-1862.

da-Silva,W.S., Gomez-Puyou,A., de Gomez-Puyou,M.T., Moreno-Sanchez,R., De Felice,F.G., de,M.L., Oliveira,M.F., and Galina,A. (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J.Biol.Chem.* 279:39846-39855.

da-Silva,W.S., Rezende,G.L., and Galina,A. (2001) Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J.Exp.Bot.* 52:1191-1201.

Dai,N., Kandel-Kfir,M., Petreikov,M., Hanael,R., Levin,I., Ricard,B., Rothan,C., Schaffer,A.A., and Granot,D. (2002) The tomato hexokinase LeH XK1 cloning, mapping, expression pattern and phylogenetic relationships. *Plant Science* 163:581-590.

Dai,N., Schaffer,A., Petreikov,M., Shahak,Y., Giller,Y., Ratner,K., Levine,A., and Granot,D. (1999) Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11:1253-1266.

Damari-Weissler,H., Ginzburg,A., Gidoni,D., Mett,A., Krassovskaya,I., Weber,A.P., Belausov,E., and Granot,D. (2007) Spinach SoH XK1 is a mitochondria-associated hexokinase. *Planta* 226:1053-1058.

Damari-Weissler,H., Kandel-Kfir,M., Gidoni,D., Mett,A., Belausov,E., and Granot,D. (2006) Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants. *Planta* 224:1495-1502.

Dao,L. and Friedman,M. (1992) Chlorogenic Acid Content of Fresh and Processed Potatoes Determined by Ultraviolet Spectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:2152-2156.

Delaplace,P., Fauconnier,M.L., Sergeant,K., Dierick,J.F., Oufir,M., van der,W.F., America,A.H., Renaut,J., Hausman,J.F., and du,J.P. (2009) Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing induces changes in the proteome and antioxidants associated with the sprouting pattern. *J.Exp.Bot.* 60:1273-1288.

Deutscher,M.P. (1990) Maintaining protein stability. In *Guide to protein purification, Methods in enzymology*, Academic Press Inc, pp. 83-89.

Ellis,K.J. and Morrison,J.F. (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* 87:405-426.

Emanuelsson,O., Nielsen,H., Brunak,S., and von,H.G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J.Mol.Biol.* 300:1005-1016.

Farré,E.M., Tiessen,A., Roessner,U., Geigenberger,P., Trethewey,R.N., and Willmitzer,L. (2001) Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiology* 127:685-700.

Fernie,A.R. and Willmitzer,L. (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol* 127:1459-1465.

Fernie,A.R., Willmitzer,L., and Trethewey,R.N. (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci.* 7:35-41.

Frommer,W.B., Schulze,W.X., and Lalonde,S. (2003) Plant science. Hexokinase, Jack-of-all-trades. *Science* 300:261-263.

Galina,A. and da Silva,W.S. (2000) Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. phytochemistry 53:29-37.

Galina,A., Logullo,C., de Souza,E.F., Rezende,G.L., and da Silva,W.S. (1999) Sugar phosphorylation modulates ADP inhibition of maize mitochondrial hexokinase. Physiologia Plantarum 105:17-23.

Galina,A., Reis,M., Albuquerque,M.C., Puyou,A.G., Puyou,M.T., and de,M.L. (1995) Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. Biochem.J. 309 (Pt 1):105-112.

Gegenheimer,P. (1990) Preparation of Extracts from Plants. In Guide to protein purification, Methods in enzymology, Academic Press Inc, pp. 174-193.

Geigenberger,P., Fernie,A.R., Gibon,Y., Christ,M., and Stitt,M. (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. Biol.Chem. 381:723-740.

Gekko,K. and Timasheff,S.N. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. Biochemistry 20:4667-4676.

German,M.A., Asher,I., Petreikov,M., Dai,N., Schaffer,A.A., and Granot,D. (2004) Cloning, expression and characterization of LeFRK3, the fourth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gene encoding fructokinase. Plant Science 166:285-291.

German,M.A., Dai,N., Chmelnitsky,I., Sobolev,I., Salts,Y., Barg,R., Schaffer,A.A., and Granot,D. (2002) LeFRK4, a novel tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fructokinase specifically expressed in stamens. Plant Science 163:607-613.

Gibson,D.M. and Shine,W.E. (1983) Uridine diphosphate glucose breakdown is mediated by a unique enzyme activated by fructose 2,6-bisphosphate in *Solanum tuberosum*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 80:2491-2494.

Giege,P., Heazlewood,J.L., Roessner-Tunali,U., Millar,A.H., Fernie,A.R., Leaver,C.J., and Sweetlove,L.J. (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. Plant Cell 15:2140-2151.

Giese, J.O., Herbers, K., Hoffmann, M., Klosgen, R.B., and Sonnewald, U. (2005) Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. FEBS Lett. 579:827-831.

Godbole, S., Gote, S., Latkar, M., and Chakrabarti, T. (2003) Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate-starch blend films. Bioresour. Technol. 86:33-37.

Graham, J.W., Williams, T.C., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., and Sweetlove, L.J. (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. Plant Cell 19:3723-3738.

Granot, D. (2008) Putting plant hexokinases in their proper place. phytochemistry 69:2649-2654.

Hoogenboom, B.W., Suda, K., Engel, A., and Fotiadis, D. (2007) The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. J.Mol.Biol. 370:246-255.

Jang, J.C., Leon, P., Zhou, L., and Sheen, J. (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell 9:5-19.

Jang, J.C. and Sheen, J. (1994) Sugar sensing in higher plants. Plant Cell 6:1665-1679.

Kanayama, Y., Dai, N., Granot, D., Petreikov, M., Schaffer, A., and Bennett, A.B. (1997) Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato. Plant Physiol 113:1379-1384.

Kandel-Kfir, M., mari-Weissler, H., German, M.A., Gidoni, D., Mett, A., Belausov, E., Petreikov, M., Adir, N., and Granot, D. (2006) Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular localization. Planta 224:1341-1352.

Karve, A., Rauh, B.L., Xia, X., Kandasamy, M., Meagher, R.B., Sheen, J., and Moore, B.D. (2008) Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. Planta 228:411-425.

Kim,M., Lim,J.H., Ahn,C.S., Park,K., Kim,G.T., Kim,W.T., and Pai,H.S. (2006) Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 18:2341-2355.

Kohn,W.D., Kay,C.M., and Hodges,R.S. (1997) Salt effects on protein stability: two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs. *J.Mol.Biol.* 267:1039-1052.

Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Li,H. and Roux,S.J. (1992) Casein kinase II protein kinase is bound to lamina-matrix and phosphorylates lamin-like protein in isolated pea nuclei. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:8434-8438.

Martinez-Barajas,E. and Randall,D.D. (1998) Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. *Planta* 205:567-573.

Menu,T., Rothan,C., Dai,N., Petreikov,M., Etienne,C., strac-Irvine,A., Schaffer,A., Granot,D., and Ricard,B. (2001) Cloning and characterization of a cDNA encoding hexokinase from tomato. *Plant Sci.* 160:209-218.

Meyer,L.E., Machado,L.B., Santiago,A.P., da-Silva,W.S., De Felice,F.G., Holub,O., Oliveira,M.F., and Galina,A. (2006) Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J.Biol.Chem.* 281:37361-37371.

Miernyk,J.A. and Dennis,D.T. (1983) Mitochondrial, plastid, and cytosolic isozymes of hexokinase from developing endosperm of *Ricinus communis*. *Arch.Biochem.Biophys.* 226:458-468.

Moore,B., Zhou,L., Rolland,F., Hall,Q., Cheng,W.H., Liu,Y.X., Hwang,I., Jones,T., and Sheen,J. (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300:332-336.

Nakai,K. and Kanehisa,M. (1991) Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11:95-110.

Neugebauer Judith M (1990) Detergents: An Overview. In Guide to protein purification, Methods in enzymology, Academic Press Inc, pp. 239-253.

Niittyla,T., Messerli,G., Trevisan,M., Chen,J., Smith,A.M., and Zeeman,S.C. (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. Science 303:87-89.

Nunes-Nesi,A., Carrari,F., Lytovchenko,A., and Fernie,A.R. (2005) Enhancing crop yield in Solanaceous species through the genetic manipulation of energy metabolism. Biochem.Soc.Trans. 33:1430-1434.

Olsson,T., Thelander,M., and Ronne,H. (2003) A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. Journal of Biological Chemistry 278:44439-44447.

Peeters,N. and Small,I. (2001) Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. Biochim.Biophys.Acta 1541:54-63.

Pego,J.V., Kortstee,A.J., Huijser,C., and Smeekens,S.C. (2000) Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. J.Exp.Bot. 51 Spec No:407-416.

Pego,J.V. and Smeekens,S.C. (2000) Plant fructokinases: a sweet family get-together. Trends Plant Sci. 5:531-536.

Pego,J.V., Weisbeek,P.J., and Smeekens,S.C. (1999) Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. Plant Physiol 119:1017-1023.

Plaxton,W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47:185-214.

Raimbault,C., Couthon,F., Vial,C., and Buchet,R. (1995) Effects of pH and KCl on the conformations of creatine kinase from rabbit muscle. Infrared, circular dichroic and fluorescence studies. Eur.J.Biochem. 234:570-578.

Rasmusson,A.G. and Agius,S.C. (2001) Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in plants: Immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria. Plant Physiology and Biochemistry 39:1057-1066.

Renz,A., Merlo,L., and Stitt,M. (1993) Partial-Purification from Potato-Tubers of 3 Fructokinases and 3 Hexokinases Which Show Differing Organ and Developmental Specificity. *Planta* 190:156-165.

Renz,A. and Stitt,M. (1993) Substrate-Specificity and Product Inhibition of Different Forms of Fructokinases and Hexokinases in Developing Potato-Tubers. *Planta* 190:166-175.

Rezende,G.L., Logullo,C., Meyer,L., Machado,L.B., Oliveira-Carvalho,A.L., Zingali,R.B., Cifuentes,D., and Galina,A. (2006) Partial purification of tightly bound mitochondrial hexokinase from maize (*Zea mays* L.) root membranes. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 39:1159-1169.

Rivoal,J., Trzos,S., Gage,D.A., Plaxton,W.C., and Turpin,D.H. (2001) Two unrelated phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides physically interact in the high molecular mass isoforms of this enzyme in the unicellular green alga *Selenastrum minutum*. *J.Biol.Chem.* 276:12588-12597.

Roberts,J.K., Callis,J., Wemmer,D., Walbot,V., and Jardetzky,O. (1984) Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:3379-3383.

Rojas-Beltran,J.A., Dejaeghere,F., Kotb,M.A., and du Jardin,P. (2000) Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research* 43:383-393.

Rolland,F., Moore,B., and Sheen,J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14 Suppl:S185-S205.

Rolland,F. and Sheen,J. (2005) Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochem.Soc.Trans.* 33:269-271.

Schleucher,J., Vanderveer,P.J., and Sharkey,T.D. (1998) Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant Physiol* 118:1439-1445.

Sengar,R.S., Gautam,M., Sengar,R.S., Garg,S.K., Sengar,K., and Chaudhary,R. (2008) Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Rev.Enviro.n.Contam Toxicol.* 196:73-93.

Shatkay,H., Høglund,A., Brady,S., Blum,T., Donnes,P., and Kohlbacher,O. (2007) SherLoc: high-accuracy prediction of protein subcellular localization by integrating text and protein sequence data. *Bioinformatics* 23:1410-1417.

Sonnewald,U., Hajirezaei,M.R., Kossmann,J., Heyer,A., Trethewey,R.N., and Willmitzer,L. (1997) Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nat.Biotechnol.* 15:794-797.

Stark,D.M., Timmerman,K.P., Barry,G.F., Preiss,J., and Kishore,G.M. (1992) Regulation of the Amount of Starch in Plant-Tissues by Adp Glucose Pyrophosphorylase. *Science* 258:287-292.

Stumpf,P.K. (1953) Glycolytic enzymes in higher plants. *Annual Review of plant physiology* 3:17-34.

Sussman,M., Mieog,J.C., Doyle,J., Victor,S., Willis,B.L., and Bourne,D.G. (2009) *Vibrio* zinc-metalloprotease causes photoinactivation of coral endosymbionts and coral tissue lesions. *PLoS.ONE.* 4:1-14.

**Sweetlove,L.J., Burrell,M.M., and ap,R.T. (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase
1. *Biochem.J.* 320 (Pt 2):493-498.**

Thomas,S., Mooney,P.J., Burrell,M.M., and Fell,D.A. (1997a) Finite change analysis of glycolytic intermediates in tuber tissue of lines of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) overexpressing phosphofructokinase. *Biochem.J.* 322 (Pt 1):111-117.

Thomas,S., Mooney,P.J., Burrell,M.M., and Fell,D.A. (1997b) Metabolic Control Analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. *Biochem.J.* 322 (Pt 1):119-127.

Trethewey,R.N., Riesmeier,J.W., Willmitzer,L., Stitt,M., and Geigenberger,P. (1999) Tuber-specific expression of a yeast invertase and a bacterial glucokinase in potato leads to an activation of sucrose phosphate synthase and the creation of a sucrose futile cycle. *Planta* 208:227-238.

Turner,J.F. and Copeland,L. (1981) Hexokinase II of pea seeds. *Plant Physiol* 68:1123-1127.

van der Hoorn,R.A. (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu.Rev.Plant Biol.* 59:191-223.

Veramendi,J., Fernie,A.R., Leisse,A., Willmitzer,L., and Trethewey,R.N. (2002) Potato hexokinase 2 complements transgenic *Arabidopsis* plants deficient in hexokinase 1 but does not play a key role in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Mol.Biol.* 49:491-501.

Veramendi,J., Roessner,U., Renz,A., Willmitzer,L., and Trethewey,R.N. (1999) Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* 121:123-134.

Walker,R.P. and Leegood,R.C. (1995) Purification, and phosphorylation in vivo and in vitro, of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. *FEBS Lett.* 362:70-74.

Weber,A., Servaites,J.C., Geiger,D.R., Kofler,H., Hille,D., Groner,F., Hebbeker,U., and Flugge,U.I. (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 12:787-802.

Weise,S.E., Weber,A.P., and Sharkey,T.D. (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* 218:474-482.

Wiese,A., Groner,F., Sonnewald,U., Deppner,H., Lerchl,J., Hebbeker,U., Flugge,U.I., and Weber,A. (1999) Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *Febs Letters* 461:13-18.

Wiltshire J.J.J. and Cobb A.H. (1996) A review of the physiology of potato tuber dormancy. *Ann.appl.Biol.* 129:553-569.

Winter,H., Robinson,D.G., and Heldt,H.W. (1994) Subcellular Volumes and Metabolite Concentrations in Spinach Leaves. *Planta* 193:530-535.

Xiao, W.Y., Sheen, J., and Jang, J.C. (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology* 44:451-461.

Yamamoto, Y.T., Prata, R.T.N., Williamson, J.D., Weddington, M., and Pharr, D.M. (2000) Formation of a hexokinase complex is associated with changes in energy utilization in celery organs and cells. *Physiologia Plantarum* 110:28-37.

Yanagisawa, S., Yoo, S.D., and Sheen, J. (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425:521-525.

Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., and Koch, K.E. (1999) Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant Physiol* 121:599-608.